



Diversité génétique et aromatique de la truffe de Bourgogne

Virginie Molinier

► To cite this version:

Virginie Molinier. Diversité génétique et aromatique de la truffe de Bourgogne. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS021 . tel-01145801

HAL Id: tel-01145801

<https://theses.hal.science/tel-01145801>

Submitted on 27 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS-SANTE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

UMR 1347 AGROÉCOLOGIE AGROSUP/INRA/UB POLE IPM CNRS ERL 6300

UFR SCIENCES DE LA VIE, DE LA TERRE ET DE L'ENVIRONNEMENT

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement
Spécialité Biologie Végétale et Biologie Evolutive

Par

Virginie MOLINIER

Diversité génétique et aromatique de la truffe de Bourgogne



Soutenance le 25/04/2013 devant le jury composé de :

<u>François BUSCOT</u> ,	Professeur	UFZ Centre for Environmental Research, Leipzig-Halle, D	Rapporteur
<u>Christophe ROUX</u> ,	Professeur	Université Toulouse III	Rapporteur
<u>Henri FROCHOT</u> ,	Ingénieur de recherches retraité	Centre INRA de Nancy	Examineur
<u>Sylvain JEANDROZ</u> ,	Professeur	AgroSup Dijon	Examineur
<u>Claude MURAT</u> ,	Ingénieur de recherches	Centre INRA de Nancy	Examineur
<u>Richard SPLIVALLO</u> ,	Docteur	Georg-August-University Goettingen, D	Examineur
<u>Daniel WIPE</u> ,	Professeur	Université de Bourgogne	Directeur de Thèse
<u>Armelle GOLLOTTE</u> ,	Docteur	Inopiant, Aiserey	Co-encadrante de Thèse



Les illustrations humoristiques « champignonesques » sont toutes tirées de l'ouvrage « Le gratin des champignons » de Roland Sabatier et Georges Becker aux éditions Glénat (2004).

Remerciements



Ah ! Un des meilleurs moments durant la rédaction d'une thèse : les remerciements !

Meilleur moment, oui, mais redoutable aussi !

Il faut essayer de remercier toutes les personnes qui ont compté durant ces trois ans sans oublier personne... (Enfin, sauf si c'est intentionnel...)

Je souhaite tout d'abord remercier **Vivienne Gianinazzi-Pearson** pour son accueil au sein de l'UMR Plante-Microbe-Environnement. Je tiens aussi à remercier **Philippe Lemanceau** et **Françoise Simon-Plas** pour leur accueil au sein de l'UMR Agroécologie et plus précisément au sein du Pôle IPM.

Je tiens à remercier les membres du jury : **Sylvain Jeandroz**, **François Buscot**, **Christophe Roux**, **Claude Murat**, **Richard Splivallo** et **Henri Frochot** d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier **Marc André Sélosse**, **Dirk Redecker** et **Diederik van Tuinen** pour leurs conseils lors des comités de suivi de thèse.

Je tiens aussi à remercier le **Conseil régional de Bourgogne** pour le financement de ma thèse qui était intégrée dans le dispositif « Jeune Chercheur Entrepreneur ».

Et puis... je tiens à te remercier toi, **Daniel**. Tout d'abord professionnellement, merci pour ton encadrement de qualité qui laisse une grande place à l'autonomie et à la prise de décision. Merci pour m'avoir supervisée et supportée durant ces trois années qui m'ont permis de découvrir un monde passionnant. Je tiens aussi à te remercier d'un point de vue plus personnel. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles... mais aussi dans les moments plus drôles (et y'en a eu..). Alors un grand merci ! Et pour le coup, je ne me censure pas... !

Je tiens à remercier **Inoplant** et je te remercie **Armelle** pour toute l'aide que tu m'as donnée. Merci pour tes conseils avisés et tes idées constructives.

Merci à **Diederick van Tuinen** et **Dirk Redecker**, Merci pour le temps que vous avez pris pour moi et pour vous être plongés dans la truffe. On peut dire que « la 3D » team assure !

Merci à vous **Claude** et **Richard** pour toute l'aide apportée pour les analyses et la rédaction des articles. Merci pour tout.

J'aimerais remercier mes deux « papi truffes » **Gérard Chevalier** et **Henri Frochot** pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci pour toutes les informations que vous avez pu me donner. Je remercie également **Tignon et ses prédécesseurs** car sans eux, pas de travail de terrain en truffière !

Je remercie également **tous les membres de l'association de la truffe Côte d'Orienne** et sa présidente actuelle **Christine Dupaty**. Un tendre merci particulier à vous, **Françoise Lavier** (présidente de cœur) pour toutes les discussions qu'on a eu ensemble.

Je remercie également la **Confrérie de la truffe de Bourgogne**.

Un grand merci à l'équipe de choc (et de charme) du secrétariat : **Christine, Pauline, Samuel, Catherine, Sandrine, Francine et Fabienne** !! Votre gestion pour tous les « à côté » de la recherche m'a bien aidé ! Merci !

Et puis, pêle-mêle :

*Merci à toi « **Mama Odile** » pour ton sourire et ta bonne humeur constante (fais gaffe... ça tourne là...),

*Merci à toi **Ghislaine** pour nos échanges « sur le balcon » (et grâce à toi, j'ai pu manger à la cantine),

*Merci à toi **Christine Arnould** pour ta « bonne composition » face à mes blagues souvent lourdes (mais tu m'as souvent tendu la perche),

*Merci à toi **Annie** pour tous ces éclats de rire communicatifs,

*Merci à toi **Valérie** pour tous les moments qu'on a pu passer (au labo et à l'extérieur),

*Merci à toi **Francine** pour m'avoir souvent sauvé la vie à coup de pansements face à une lame de scalpel bien trop pressée...

*Merci à toi **Diederik** alias « Docteur Diedou » pour toujours être là quand il faut. Merci pour tes idées et pour ton aide pendant ces trois ans. Un « n hollandais » comme toi, ça nous change de Dave et ça nous réconcilie avec l'Edam... !

*Merci à vous : **Eliane, Marie-Noëlle, Laurent, Hoai-Nam, Dominique, Jonathan (« Jo »), Christelle, Eric, Franck, Monsieur Cacas (« Juanito »), Olivier (Martin), Agnès.**

***Merci à toutes les personnes du labo** : travailler c'est bien mais dans un environnement sympa, c'est mieux !! Et c'était le cas ici ! Vous allez me manquer !

*Merci au clan des « vieux »...ils se reconnaîtront et : N'oubliez pas de vous hydrater.... !

*Merci à vous les copains du labo :

*Merci à toi **Jérôme** alias « Jéjé la saumure ». Merci pour tous les cafés Nespresso qu'on a pris ensemble et qui donnaient lieu à des discussions enflammées et des ralages interminables. Merci pour ton aide en matière de repérage de marques de voitures. Et merci pour tout le reste ! Ta bonne humeur va vraiment me manquer ! Merci à toi et à **Géraldine**... gros poutou au Pitiou !

*Merci **Soukayna**. J'ai passé de très bons moments avec toi et tu as toujours été là pour les autres moments moins faciles. Au-delà d'une collègue de bureau géniale, tu resteras pour moi une vraie amie. Merci de m'avoir enseigné à faire « la chose » !! Habbibte !

*Merci à vous deux les pouliches **Joan** et **Thibaud** pour votre humour et pour tous ces bons moments passés dans le bureau 603 et ailleurs. Vous êtes vraiment de vrais chevaliers (de la charrette). Et puis, j'espère que votre transit va mieux ! Vous resterez pour moi, (*virgule*) des amis...

* Merci à toi **Marine**. Que de rigolades, de sourire et de bonne humeur !!!! Toujours là quand il faut, où il faut ! Ton rire hybride mi-Farrugia mi-otarie me manquera beaucoup !! Bon courage pour ta fin de thèse ! (*Putain, je me suis faite une amie parigote...*)

*Merci à toi **Marie....-Lara** pour m'avoir supportée ces derniers mois dans le bureau...et pour les moments de rigolades entre poules. Comme je te l'ai dit : tu es arrivée pile au bon moment et j'en suis très heureuse !... Même si tu m'as souvent mise en « bruit de fond » et malgré tous les stabilo que tu as pu recevoir, nous avons passé de très bons moments. Merci pour tes cours de ponctuation (notamment en matière de virgules).

* Merci **Magda**. J'ai découvert que les allemandes pouvaient avoir de l'humour grâce à toi... ! Merci pour toutes ces sorties qui me menaient à dormir sur ton canapé (d'ailleurs ton canapé me manque...même si j'ai trouvé depuis celui de **Marine**).

*Merci à toi **Vedette Stawislas** pour ta constante bonne humeur et pour m'avoir fait découvrir le poisson pourri...(je ne te remercie pas par contre pour ton passage remarqué dans mes toilettes),

* Merci aux « grands » post-docs : **Herbert (Bébert)**, **Léo di Caprio** (mon meilleur ennemi végétarien avec qui ce fut un plaisir de partager à la fois les paillasses et les plats de pâtes !) et sans oublier **Ivan** mon prince espagnol préféré,

*Merci à toi **Marie T** pour ton amitié. Le temps passé ensemble au bureau 605 a été court, mais par la suite, que ce soit sur Marburg ou sur Dijon, les échanges ont continué.

*Merci à vous **David B** et **Nicolas L.** pour les petits moments matinaux caféinés.

* Merci à vous **Lucka, Ian, Emilie, Iulia** (my favorite monster), **Nassima, Olivier & Tomazzo**. Bon courage pour la suite !!

*Merci à toute la « JCE » team et plus particulièrement merci à vous **Laurianne, Nico, Souhayel et Alban**. Grâce à vous les cours de master ont été plus faciles à suivre. Et grâce à vous, j'ai développé mon addiction au KFC...

*Merci à vous **Patricia Jargeat** pour m'avoir encouragé à postuler à cette thèse. Grâce à vous, j'ai découvert la région Bourgogne et tout ce qui va avec. Depuis mon Master 1, vous avez toujours pris une place particulière dans mon parcours.

*Merci à toi **Caro l'aveyronnaise** (expatriée à Paris). Tu as toujours été là pour moi au bout du fil à la fois pour les rires et pour les larmes... Je t'ai connu il y a une décennie et je pense que tu ne vas pas te débarrasser de moi si vite ! En plus, grâce à toi, j'ai un nouveau projet important à mener à bien en mai !! (*Je stresse déjà*).

*Merci à toi **Clémence**. Même éloignées, on a toujours essayé de rester proches avec plus ou moins des difficultés. Durant ces trois ans, nos sorties toulousaines et beaucoup d'autres choses m'ont manqué ... Je vais essayer de me rattraper d'ici peu !

*Merci à toi: **Elo Boulew**. Tu as un nouveau rôle maintenant avec Paul le Petit Boulew ! Mais tu as toujours « la classe américaine » !

*Merci à vous : **Joris** mon autre pote aveyronnais (*décidément, ça devient une habitude de pactiser avec l'ennemi...*), **Cécilou et Jo**, **Pauline** mon binome forever, **Vincent le Blond**, **Alfred et Nico** mes chanteurs préférés.

Et puis, j'aimerais remercier toute ma famille.

Merci à vous tous : **les Taties, les Tontons, les Cousines, les Cousins & les pièces rattachées (hein Olivier..) !!**

Et plus particulièrement : Un **énorme** merci à mes parents qui ont subi par téléphones interposés mes coups de cœur et coup de gueule durant ces trois ans assez intenses. Ils m'ont toujours soutenu et répondu présents. J'ai une tendre pensée pour **mon père** qui m'avait toujours soutenu depuis le début de la thèse et qui n'est malheureusement pas là aujourd'hui pour en voir la fin. J'aurai tant aimé qu'il soit présent et j'espère qu'il aurait été fier de moi. Ah !! **Maman et Steph** ! Que dire à part : un grand merci à toute les deux !!! Merci pour votre force qui m'a aidé durant ces derniers mois difficiles.

Famille, je vous M ! (Molinier , ça commence par un « M » ...coïncidence, je ne crois pas... !)

Et pour finir... mais le meilleur pour la fin : **Merci à toi Thierry !**

Merci d'avoir été là, de m'avoir suivi dans le « Nooooooord » (« Dijon c'est tout de même au dessus de Clermont Ferrand »). Merci de m'avoir supportée en vrai au quotidien pendant ces trois ans pas faciles faciles... Tu as vraiment été extraordinaire et je t'aime « atal ». Maintenant, de nouvelles aventures nous attendent... pour le rire et pour le meilleur !

Vous tous qui avez participé scientifiquement ou plus personnellement à cette thèse (et consciemment ou non d'ailleurs) : je vous remercie sincèrement !

Merci à tous !!
Virginie

Résumé

Les Truffes sont des champignons ascomycètes ectomycorhiziens appartenant à la famille des *Tuberaceae* et plus précisément au genre *Tuber*. On dénombre à ce jour plus d'une trentaine d'espèces de *Tuber* en Europe. Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes plus précisément focalisés sur le modèle *Tuber aestivum-uncinatum*. Cette truffe communément appelée « Truffe de Bourgogne » présente un intérêt à la fois gastronomique et culturel.

La première partie de ce travail de thèse a porté sur la clarification du statut taxonomique de la truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum*). Pour cela, nous avons utilisé une approche multi-marqueurs combinant des marqueurs génétiques couramment utilisés à l'échelle interspécifique. Nos analyses ont montré que les deux taxons *Tuber aestivum* (la truffe d'été) et *Tuber uncinatum* sont conspécifiques.

Durant la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique de *Tuber aestivum*. Pour cela, nous avons tout d'abord développé des marqueurs microsatellites spécifiques par une approche de « direct shotgun pyrosequencing ». Cette méthode a permis le développement de 15 marqueurs microsatellites polymorphes. Nous les avons ensuite utilisés pour géotyper des individus provenant de différentes localisations en Europe. Nous avons pu identifier quatre sous populations différenciées qui ne correspondent pas, pour la majorité, à une répartition géographique. Cependant, un des clusters se différencie des autres à la fois par sa situation géographique (sud de la France) et ses caractéristiques génétiques (présence d'allèles rares). Ces résultats préliminaires pourraient indiquer l'existence d'un écotype particulier attaché à une écologie méridionale, *Tuber aestivum sensu stricto*.

Nous nous sommes ensuite intéressés, dans la troisième partie de ce travail de thèse à la diversité aromatique de *Tuber aestivum* à l'échelle locale. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence l'existence d'une différenciation modérée entre les individus issus d'une truffière naturelle et les individus issus d'une truffière plantée. D'une saison de récolte à l'autre, une stabilité génotypique a été observée. Au niveau aromatique, seuls les composés C8 semblent être liés aux génotypes.

Dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'analyse de données de récolte sur plus de trente ans au sein d'une truffière plantée de noisetiers inoculés initialement par *Tuber melanosporum*. Grâce à des analyses statistiques simples, nous avons pu noter les fluctuations tant en quantité qu'en poids des truffes récoltées suivant les saisons et les arbres truffiers. Il apparaît que le remplacement de *Tuber melanosporum* par *Tuber aestivum* s'est fait de manière très rapide (trois ans). La disparition de *Tuber melanosporum* peut probablement être expliquée par la fermeture de la canopée des noisetiers, *Tuber melanosporum* n'appréciant pas un ombrage excessif.

Mots clés : *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, Analyses phylogénétiques, Polymorphisme, Marqueurs microsatellites, Diversité, Composés organiques volatils

Abstract

Truffles are ectomycorrhizal Ascomycota fungi belonging to the *Tuberaceae* family and more specifically to the *Tuber* genus. More than thirty *Tuber* species are currently described in Europe. In this thesis, we specifically focused on the *Tuber aestivum-uncinatum* model. This truffle is commonly called "Burgundy Truffle" and has a gastronomic and cultural interest.

The first part of this thesis focused on the taxonomic status of the Burgundy truffle (*Tuber uncinatum*). For this, we used a multi-marker approach combining several genetic markers commonly used at the interspecific scale. Our analyses showed that the two taxa, *Tuber aestivum* (summer truffle) and *Tuber uncinatum* are conspecific.

In the second part, we addressed the genetic diversity of *Tuber aestivum*. To do this, we firstly developed specific microsatellite markers by "direct shotgun pyrosequencing". This method has allowed the development of 15 polymorphic microsatellite markers. Then, we used those markers to genotype individuals from different European locations. We have identified four differentiated subpopulations that not correspond, for the majority, to a geographical distribution. However, one cluster differs from the others by its location (south of France) and its genetic characteristics (presence of rare alleles). These preliminary results may indicate the existence of a particular ecotype attached to a southern ecology: *Tuber aestivum sensu stricto*.

We were then interested, in the third part of this thesis, to the aromatic diversity of *Tuber aestivum* at a local scale. Our results highlight the existence of a moderate differentiation between individuals from a natural truffle orchard and individuals from planted orchard. From one season to another, genotypic stability was observed. Only C8 volatile organic compounds seem to be related to the genotypes.

In the last part, we analyzed harvesting data, over more than thirty years, from an hazelnut truffle orchard initially inoculated by *Tuber melanosporum*. Through simple statistical analyzes, we noted changes in both quantity and weight of truffles harvested according to the seasons and hazelnut trees. It appears that *Tuber aestivum* rapidly replaced *Tuber melanosporum* (in three years). The disappearance of *Tuber melanosporum* can probably be explained by the canopy closure; *Tuber melanosporum* not appreciating excessive shading.

Keywords: *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, Phylogenetic analyses, Polymorphism, Microsatellite markers, Diversity, Volatile organic compounds

Liste des Abréviations

Abréviation	Signification
ACPR	ancêtre commun le plus récent
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNmt	acide désoxyribonucléique mitochondrial
AFLP	amplified fragment-length polymorphism
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AOC	appellation d'origine contrôlée
AOP	appellation d'origine protégée
APS	adénosine 5' phosphosulfate
ARN	acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BSC	Biological species concept / concept d'espèce biologique
Chat.	Chatin
COV	Composés organiques volatils
DMDS	Disulfure de diméthyle
DMS	Diméthylsulfure
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)
DSP	Direct shotgun pyrosequencing
ECM	Ectomycorhizes
ESC	Ecological species concept / concept d'espèce écologique
FIASCO	Fast isolation by AFLP of sequences containing repeats
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry / chromatographie gazeuse couplée en spectrométrie de masse
GCPSR	Genealogical concordance phylogenetic species recognition / concept de reconnaissance d'espèce phylogénétique par concordance généalogique
IAM	Infinite allele model / modèle en nombre infini d'allèles
ICBN	International code of botanical nomenclature
ICN	International code of nomenclature
ITS	Internal transcribed spacer
MA	Mycorhize à arbuscules
MAT	Mating-type locus
MCMC	Chaines de Markov avec technique de Monte Carlo
MSC	Morphological species concept / concept d'espèce morphologique
mtLSU	Grande sous-unité ribosomique mitochondriale
mtSSU	Petite sous-unité ribosomique mitochondriale
nuLSU	Grande sous-unité ribosomique nucléaire
nuSSU	Petite sous-unité ribosomique nucléaire
PA	Polyacrylate

Abréviation	Signification
PCR	Polymerase chain reaction / réaction en chaîne par polymérase
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PDMS-DVB	Polydiméthylsiloxane-divinylbenzène
PIMA	PCR isolation of microsatellite arrays
PPi	Pyrophosphate
PSC	Phylogenetic species concept / concept d'espèce phylogénétique
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment-length polymorphism
RPB2	Gène qui code pour la plus large sous-unité de la ARN polymérase II
SBS	Sequencing by synthesis (séquençage par synthèse)
SC	Species criteria / critères d'espèce
SMM	Stepwise mutation model / modèle pas à pas
SNP	Single-nucleotide polymorphism /polymorphisme nucléotidique
SPME	Solid phase microextraction / microextraction en phase solide
SSR	Simple sequence repeat
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
UTH	Unités taxonomiques hypothétiques
UTO	Unités taxonomiques opérationnelles
Vitt.	Vittadini

Table des matières

Liste des Figures.....	16
Liste des Tableaux.....	17
Préambule.....	19
Introduction Générale et Objectifs de la thèse.....	21
Synthèse bibliographique.....	25
Partie I : Contexte théorique	27
I. Notion d'espèce et délimitation d'espèce.....	28
A. La classification du vivant.....	28
B. Délimitation des espèces en biologie.....	31
1. La notion d'espèce.....	31
2. La notion d'écotype.....	35
3. Le cas du règne fongique	38
II. De la Phylogénie à la génétique des populations.....	39
A. Qu'est ce que la phylogénie ?	39
1. Définition	39
2. Utilisation des méthodes de reconstruction probabilistes en phylogénie.....	42
a) Maximum de vraisemblance	43
b) Inférence bayésienne	47
B. Génétique des populations d'une espèce et phylogéographie	50
1. La génétique des populations	50
2. La phylogéographie	51
III. Les outils moléculaires en phylogénie et génétique des populations	53
A. Outils utilisés en phylogéographie et génétique des populations ?.....	53
B. Biais possibles en phylogéographie et génétique des populations.....	54
1. Biais méthodologiques	54
2. Biais d'interprétation :	55
C. Comment peut-on éviter ces biais ?	57
1. Biais méthodologiques :	57
2. Biais d'interprétation :	57
D. Les marqueurs microsatellites.....	59
1. Que sont les marqueurs microsatellites et quel est leur intérêt?.....	59
2. Identification et développement de marqueurs microsatellites spécifiques.....	62

3. Quels moyens pour développer des SSR spécifiques ?	62
4. Application du Direct Shotgun Pyrosequencing au développement de marqueurs microsatellites.	65
IV. Conclusion de la première partie.....	70
Partie II : Modèle d'étude : Qu'est ce que la Truffe ?.....	71
I. Champignons et symbioses ectomycorhiziennes	72
A. Les champignons au sens large.....	72
B. La symbiose mycorhizienne	75
1. Quelques généralités	75
2. La symbiose ectomycorhizienne.....	79
a) Les deux partenaires impliqués.....	79
b) Généralités sur la structure d'une ectomycorhize	80
II. Les Tubéracées et le genre <i>Tuber</i>	82
A. Description de la famille des Tuberaceae et de son apparition sur le plan évolutif	82
1. La famille des Tuberaceae et les genres qu'elle regroupe.....	82
2. Apparition des Tubéracées et évolution pezize vers truffe.....	86
3. Le genre <i>Tuber</i>	88
B. Propriétés du genre <i>Tuber</i> et différenciation des espèces <i>Tuber</i>	91
1. Les différentes phases de développement chez <i>Tuber</i>	91
2. Variations morphologiques dans le genre <i>Tuber</i>	94
3. Différences moléculaires entre espèces du genre <i>Tuber</i>	98
C. Les composés organiques volatils :.....	101
1. Que sont les composés organiques volatils (COV)?	101
2. Comment identifier les COV ?	102
3. Les composés organiques volatils chez <i>Tuber</i> et leur importance	106
III. Place socioculturelle de la truffe.....	109
A. Mythes autour de la Truffe : Toute une Histoire	109
B. Importance de la truffe.....	111
1. Intérêts gastronomiques et culturels.....	111
2. La trufficulture.....	112
IV. La Truffe de Bourgogne	116
A. Une taxonomie controversée.....	116
B. Propriétés diverses	119
1. Propriétés écologiques	119

2. Propriétés aromatiques.....	122
Chapitre I :Etude de la différenciation génétique entre <i>Tuber aestivum</i> et <i>Tuber uncinatum</i> par une approche multi-marqueurs.....	123
Article 1 : A multigene phylogeny demonstrates that <i>Tuber aestivum</i> and <i>Tuber uncinatum</i> are conspecific.	125
Chapitre II :Etude de génétique des populations de <i>Tuber aestivum</i> à l'aide de marqueurs microsatellites spécifiques	169
Article 2 : Is climate change altering the geographic distribution of truffles ?.....	173
Article 3 : First identification of polymorphic microsatellite markers in the Burgundy truffle, <i>Tuber aestivum</i> (Tuberaceae).	179
Article 4 : Ecotypes identification in <i>Tuber aestivum</i> Vittad. European populations by using specific SSR markers.....	185
Chapitre III :Etude de la variabilité aromatique de <i>Tuber aestivum</i> à l'échelle locale	215
Article 5 : Genetic and aromatic diversity of Burgundy truffles in a natural and artificial truffle orchard.....	217
Chapitre IV :Etude de la production d'une truffière plantée (noisetiers / <i>Tuber melanosporum</i>) en Bourgogne	247
Article 6 : Monitoring 30-year history of a truffle orchard: from <i>Tuber melanosporum</i> to <i>Tuber aestivum</i>	249
Discussion générale, Conclusion et Perspectives	269
A. <i>Tuber aestivum/uncinatum</i> : Dr Jekyll & Mr Hyde ?	272
B. Importance de la mise en place d'études à l'échelle locale pour mieux comprendre la biologie de <i>Tuber aestivum</i>	276
C. Conclusion générale.....	280
D. Perspectives.....	281
Annexes.....	285
Annexe 1 : Plaquette de Formation du Master 2 AE pour doctorants.....	286
Annexe 2 : Epilogue culinaire.....	293
Références bibliographiques.....	295

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Schéma représentant les grands changements dans la classification du Vivant depuis Linné (1735) jusqu' à nos jours.</i>	<i>30</i>
<i>Figure 2 : Présentation des cinq grands moteurs de l'évolution qui permettent la spéciation et donc l'obtention de nouvelles espèces.</i>	<i>31</i>
<i>Figure 3 : Variation d'écotypes de Littorina saxatilis représentée par les trois écotypes présents en Suède.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 4 : Représentation simplifiée d'une lignée (espèce) se divisant pour former deux lignées (espèces).</i>	<i>37</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématique et simplifiée d'un arbre phylogénétique.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 6 : Principaux modèles d'évolution de séquences nucléotidiques et leurs principaux paramètres.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 7 : Evolution de l'utilisation des trois méthodes de reconstruction phylogénétique ; le maximum de parcimonie, le maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne depuis l'article de Felsenstein en 1981.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 8 : Evolution du nombre d'études citant l'emploi de marqueurs SSR et SNP depuis 1990 tous règnes du vivant confondus</i>	<i>61</i>
<i>Figure 9 : Schéma général du principe de pyroséquençage.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 10 : Phylogénie et classification des champignons</i>	<i>74</i>
<i>Figure 11 : Comparaison structurale entre la mycorhize à arbuscules et l'ectomycorhize.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 12 : Observations d'ectomycorhizes de Pézizales</i>	<i>81</i>
<i>Figure 13 : Phylogénie et Classification des Tuberaceae</i>	<i>83</i>
<i>Figure 14 : Photos de spécimens des 7 genres de la famille des Tuberaceae.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 15 : Evolution supposée de la morphologie du corps fructifère des Tuberaceae.....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 16 : Estimation des temps de divergence des taxons de la famille des Tuberaceae.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 17 : Cycle de vie de Tuber melanosporum, la truffe noire du Périgord.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 18 : Différences morphologiques entre espèces du genre Tuber.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 19 : Représentation schématique de la disposition de la région ITS, des sous unités ribosomiques 18S, 5.8S et 25/28S et de la région IGS.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 20 : Schéma simplifié des étapes de l'analyse en SPME / GC-MS.....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 21 : Etude bibliographique de l'occurrence de quelques COV majeurs chez 11 espèces de Tuber</i>	<i>108</i>
<i>Figure 22 : Production de Tuber melanosporum et de Tuber brumale en France de 1903 à 2001.</i>	<i>113</i>
<i>Figure 23 : Photographie de spores de Tuber uncinatum.....</i>	<i>117</i>

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1: Grands concepts d'espèces et propriétés sur lesquelles ils sont basés.</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 2: Classification des erreurs de données de marqueurs microsatellites selon leur cause principale.</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 3 : Caractéristiques des études ayant développé des marqueurs SSR à partir de direct shotgun pyrosequencing.....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 4: Caractéristiques principales des différents types de mycorhizes.....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques des sols de truffières naturelles à Tuber uncinatum.....</i>	<i>121</i>

Préambule

En 2009, le Conseil Régional de Bourgogne a lancé un nouveau dispositif doctoral qui lie laboratoires de recherches et entreprises innovantes : le dispositif « Jeune Chercheur Entrepreneur » (JCE).

Ce dispositif comprend un contrat doctoral de trois ans et un diplôme de Master « Administration des Entreprises » dispensé à l'Institut des Administrations des Entreprises de Dijon. L'idée est de permettre au doctorant, tout en effectuant une thèse de recherche à fort potentiel d'innovation au sein d'un laboratoire, d'être en relation avec une entreprise qui le parraine et obtenir une formation diplômante en gestion des entreprises (Annexe 1).

Ma thèse s'inscrit dans ce contrat JCE et est parrainée par l'entreprise « Inopiant Bourgogne » qui est une jeune société de biotechnologies agro-environnementales spécialisée dans la production de plants biotisés d'intérêt. Ce projet de thèse, dont le sujet d'étude est la truffe de Bourgogne, a donc vu le jour de l'alliance professionnelle entre la société Inopiant et l'UMR Agroécologie Pôle « Interaction Plantes-Micro-organismes » (anciennement UMR Plante Microbe Environnement).

Introduction Générale et Objectifs de la thèse

La Truffe appartient à ces rares organismes qui font l'objet d'intérêts à la fois mystiques, culturels et commerciaux. Elle intrigua longtemps les hommes de par sa nature obscure et mystérieuse. Sur un plan scientifique, la Truffe a été, et est toujours, étudiée de façon importante. Son écologie, sa place taxonomique et ses intérêts aromatiques sont les principales caractéristiques étudiées. Au début, simples descriptions d'observations, ces études se sont peu à peu orientées vers des analyses détaillées allant du champ écologique au champ moléculaire en passant, bien sûr par le champ aromatique. Pourtant, certains points restent encore inconnus, notamment dans le cycle biologique, l'histoire évolutive et les variations inter et intra-spécifiques des Truffes.

Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes plus précisément focalisés sur le modèle *Tuber aestivum-uncinatum*. Cette truffe est communément appelée « Truffe de Bourgogne » et présente un intérêt à la fois gastronomique et culturel.

La truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum*), d'un point de vue taxonomique, a fait l'objet de plusieurs discussions. En effet, elle et la truffe d'été (*Tuber aestivum*) seraient conspécifiques pour certains auteurs et deux espèces distinctes pour d'autres. Le statut d'espèce de *Tuber uncinatum* était donc sujet à controverse. La première étape de la thèse était de clarifier le statut d'espèce de *Tuber aestivum/uncinatum* et ainsi d'étudier sa diversité génétique. Une approche impliquant plusieurs marqueurs phylogénétiques couramment utilisés à l'échelle interspécifique a été menée afin de savoir si *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* appartiennent ou non à la même espèce. (Chapitre 1).

Le taxon *Tuber aestivum/uncinatum*, qu'il comporte deux espèces proches ou une seule et même espèce, présente une large aire de répartition. En effet, on le retrouve dans la plupart des pays du continent européen de la Suède à l'Espagne, du nord au sud, et du Portugal à l'Ukraine, d'ouest en est. Des individus ont même été trouvés en Afrique du Nord et en Chine. Une telle aire de répartition laisse présager de possibles différenciations entre populations. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude de structuration génétique à grande échelle n'avait été effectuée sur ce taxon. Il n'existe de par là même aucune donnée de diversité génétique pour ce taxon dans un contexte populationnel. De ce fait, le deuxième axe de ce travail de thèse a été de conduire une étude de diversité génétique sur des échantillons de *Tuber aestivum-uncinatum* provenant de diverses populations d'Europe, le but étant d'inférer la structure génétique de ce taxon. (**Chapitre 2**).

La truffe de Bourgogne présente aussi un intérêt gastronomique de par son profil aromatique. Tout comme d'autres espèces telles que *Tuber melanosporum* (la truffe du Périgord) ou *Tuber magnatum* (la truffe blanche), différentes études ont pu mettre en évidence les composés organiques volatils présents dans ses corps fructifères. La nature de ces composés est donc assez bien connue à présent, cependant, des incertitudes persistent quant à leur variabilité (temporelle ou spatiale) au sein d'une même espèce par exemple. Le troisième axe de mon travail de thèse était donc d'étudier les différences aromatiques qui peuvent exister à l'échelle locale (truffière) entre différents échantillons de *Tuber aestivum-uncinatum* (**Chapitre 3**).

Dans les années 1970, des méthodes d'inoculation ont permis l'obtention de plants dits « truffiers » inoculés par des corps fructifères de truffes. Historiquement, *Tuber melanosporum* a été la première espèce à être utilisée en grandes plantations.

Cependant, d'autres espèces furent inoculées pour établir des plantations comme par exemple *Tuber aestivum-uncinatum*. Une des premières truffières plantées en Bourgogne a vu le jour en 1977 à Daix en Côte d'Or. Il s'agissait de noisetiers inoculés par des corps fructifères de *Tuber melanosporum*. Cette truffière a été entretenue durant les 30 dernières années et pour chaque récolte de truffe, des informations comme le poids de la truffe récoltée et son arbre producteur potentiel ont été notées. Cela se traduit par un important jeu de données tant sur un plan quantitatif que qualitatif. La quatrième partie de ce travail de thèse a donc consisté en l'exploitation des données de récoltes sur une truffière depuis 30 ans afin de dresser une analyse sur la production au sein de cette truffière. Une telle étude est un élément important en trufficulture pour émettre des recommandations aux producteurs (**Chapitre 4**).

Ce manuscrit est composé de six parties. Tout d'abord, une partie de **synthèse bibliographique** organisée en deux temps a été rédigée pour placer ce travail de thèse dans un contexte plus général. Cette synthèse est constituée, dans un premier temps, d'une partie théorique traitant de différents concepts biologiques abordés lors de cette thèse ainsi que des outils utilisés pour répondre aux questions de biologie évolutive. Dans un deuxième temps, le modèle d'étude est présenté. La deuxième partie s'intéresse à la place taxonomique de *Tuber aestivum-uncinatum* (**Chapitre 1**). La troisième partie concerne l'étude de la diversité et du polymorphisme de *Tuber aestivum-uncinatum* (**Chapitre 2**). La quatrième partie est une étude de la diversité aromatique au sein de cette espèce à une échelle locale (truffière) (**Chapitre 3**). La cinquième partie concerne les résultats de l'analyse de récolte au sein d'une truffière plantée (**Chapitre 4**). Enfin, une **discussion et conclusion générale** viendra clore ce manuscrit.

Synthèse bibliographique



Partie I : Contexte théorique

« *Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.* »
(Dobzhansky 1973)
« *Everything makes a lot more sense in the light of phylogeny.* »
(Soltis and Soltis 2000)



I. Notion d'espèce et délimitation d'espèce

A. La classification du vivant

A ce jour, il y aurait 8,7 millions ($\pm 1,3$ million) d'espèces sur Terre (Mora et al. 2011). Cependant, ce chiffre reste une estimation car il semblerait que le nombre réel soit très largement supérieur. Afin d'estimer le nombre d'espèces sur Terre, des regroupements par niveaux de taxons ont pu être effectués. Classer des organismes a toujours été une préoccupation pour les scientifiques.

A travers les siècles, différentes classifications scientifiques se sont succédées. Sans dresser une liste historique exhaustive sur les différentes approches de classification, nous pouvons considérer certains points majeurs de ce domaine (Figure 1). En effet, Linné et sa classification traditionnelle à deux règnes (*Vegetabilia* / *Animalia*) (trois en considérant le règne « *Mineralia* ») est certainement le pionnier de ce domaine (Linnaeus 1735). Il a d'ailleurs instauré la classification binomiale encore utilisée de nos jours. S'en sont suivies différentes classifications divisées soit en règnes (Balch et al. 1977; Copeland 1956; Haeckel 1866; Whittaker 1969), soit en empires (Chatton 1937) ou mêmes en domaines (Woese et al. 1990). L'un des événements majeurs a été en 1959 l'apparition du règne « Fungi » (« champignons ») dans la classification de Whittaker à quatre règnes (Whittaker 1959) (il la révisa en 1969 en 5 règnes). Auparavant, les champignons étaient plus ou moins assimilés soit au règne animal soit au règne végétal.

On admet de nos jours, sur une base de classification moderne, six règnes au maximum dans lesquels les organismes se positionnent. Même si beaucoup d'incertitudes persistent, il est plus ou moins admis qu'il existe deux empires (*Prokaryota* et *Eukaryota*) qui comprennent au total six règnes (*Bacteria*, *Protozoa*,

Chromista, *Fungi*, *Plantae* et *Animalia*) (Cavalier-Smith 1998, 2004). Cette vision est cependant discutée par certains scientifiques qui revendiquent une classification plus proche de celle de Woese à savoir une classification à trois domaines (Woese et al. 1990). C'est le cas par exemple de Lecointre et Le Guyader qui parlent de trois clades (et non pas de domaines) pour ce qui concerne la première division du vivant ; *Archaea*, *Bacteria* et *Eukaryota* (Lecointre and Le Guyader 2006). Le terme clade, en classification phylogénétique, est employé pour tout groupe d'organismes comprenant un organisme et tous ses descendants. C'est un groupe monophylétique constituant l'unité de base en classification phylogénétique. On peut donc considérer que, pour Lecointre et Le Guyader, *Archaea*, *Bacteria* et *Eukaryota* constituent les premiers clades de leur classification.

Suite à ce premier niveau de classification, d'autres rangs existent et là non plus, tout n'est pas si simple et clair. En classification traditionnelle du vivant (ou classification linnéenne) on parle de rangs taxonomiques (classes, ordres, familles, genres, etc..) dans lesquels les organismes sont répartis, souvent à partir de similarités morphologiques. En classification phylogénétique du vivant, tout comme pour le premier niveau, on parle de « clade » et de « phylum ». Actuellement, certains rangs taxonomiques tels que définis et utilisés en classification traditionnelle du vivant, de par le fait qu'ils regroupent souvent des taxons paraphylétiques ou polyphylétiques, ne sont plus reconnus. Cependant, par commodité, l'utilisation de certains rangs de classification persiste tels que les rangs « famille », « genre » et « espèce ». Cette dernière reste un des points centraux en biologie et sera plus détaillée dans les paragraphes suivants.

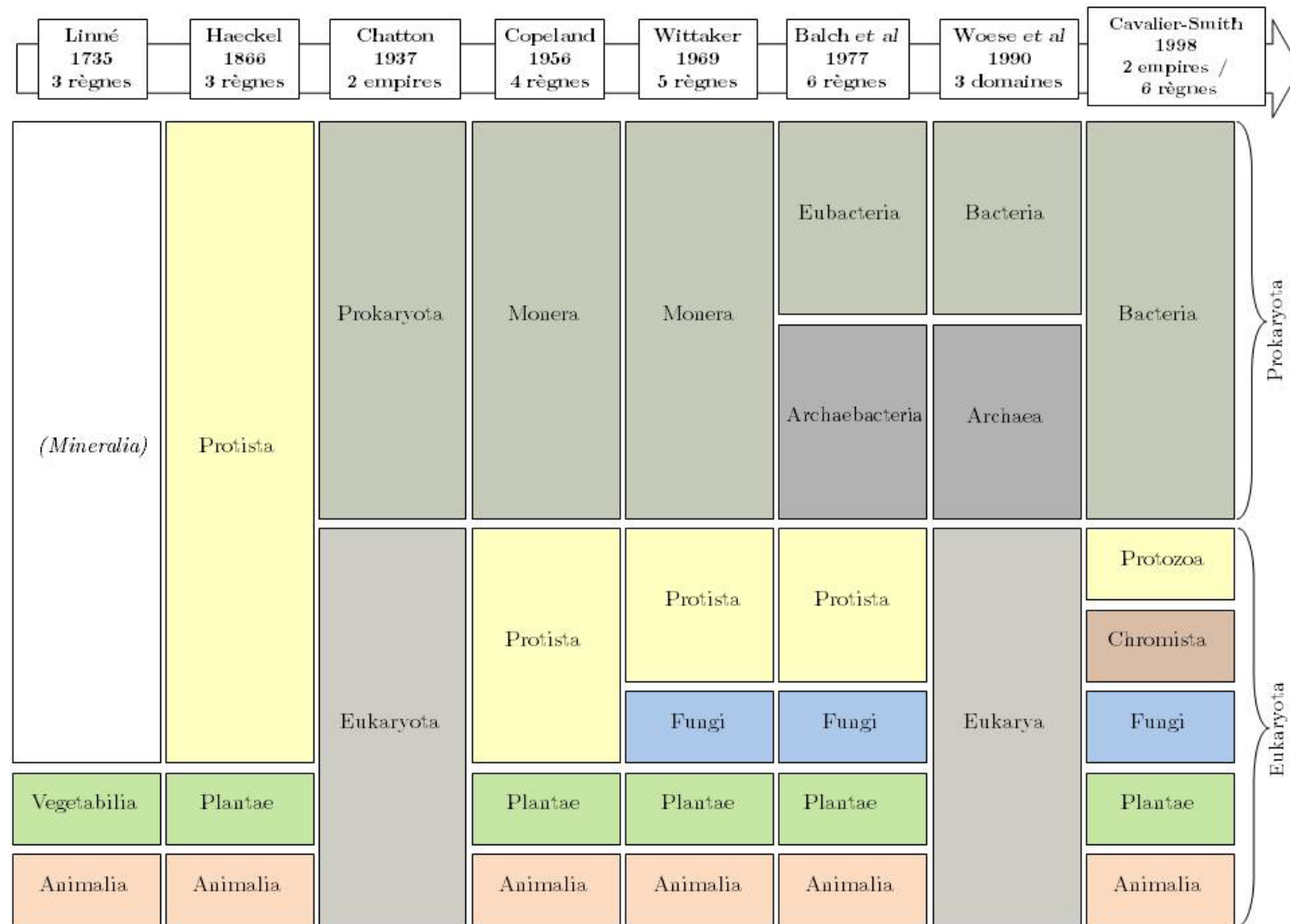


Figure 1 : Schéma représentant les grands changements dans la classification du Vivant depuis Linné (1735) jusqu' à nos jours.

(Balch et al. 1977; Cavalier-Smith 1998, 2004; Chatton 1937; Copeland 1956; Haeckel 1866; Linnaeus 1735; Whittaker 1969; Woese et al. 1990)

B. Délimitation des espèces en biologie

1. La notion d'espèce

On peut définir la biologie de l'évolution comme une partie de la biologie qui s'intéresse aux mécanismes et processus de l'évolution des espèces. Elle s'appuie également sur les observations paléontologiques et tente de retracer l'histoire de la vie sur Terre. La phylogénie, la phylogéographie, la biologie des populations, la génétique des populations, la génétique évolutive, l'écologie évolutive sont des sous-disciplines de la biologie de l'évolution.

Au sein de ce domaine, la spéciation est un processus évolutif par lequel de nouvelles espèces apparaissent. Il va de soi que cette apparition n'est pas spontanée mais la résultante de l'action de grands moteurs de l'évolution. Il existe cinq processus évolutifs : la dérive génétique, la sélection naturelle, les mutations, les migrations et la recombinaison (Figure 2). Leurs actions combinées entraînent la spéciation et donc, à terme, la formation de nouvelles espèces. La sélection naturelle reste le principal moteur de l'évolution.

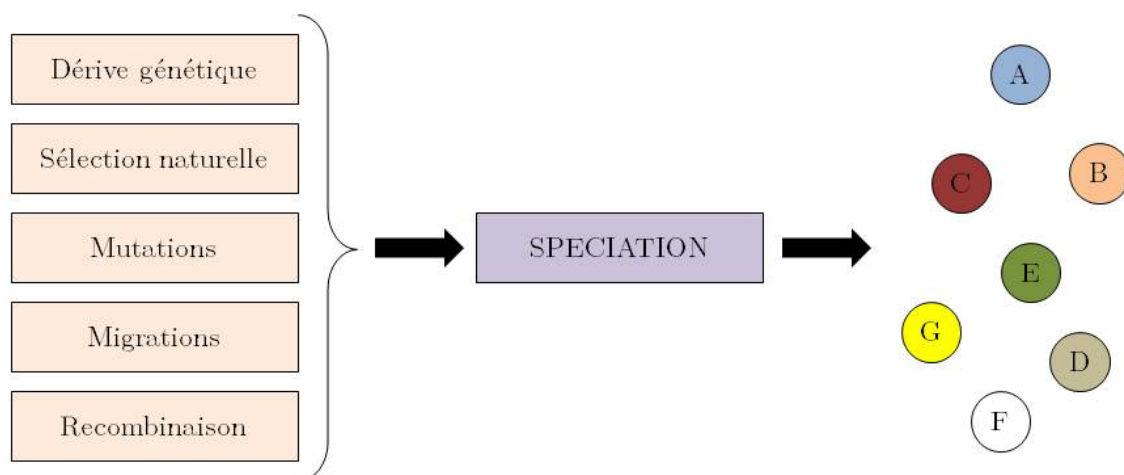


Figure 2 : Présentation des cinq grands moteurs de l'évolution qui permettent la spéciation et donc l'obtention de nouvelles espèces.

La question « Qu'est-ce qu'une espèce ? » est sans aucun doute l'une des questions qui a le plus passionné les biologistes et qui les passionne encore aujourd'hui. La réponse n'est pas si simple. La définition la plus commune et la plus utilisée pour parler d'espèce est celle donnée par Ernst Mayr qui dit qu'« une espèce est un groupe de populations naturelles effectivement ou potentiellement interfécondes qui sont isolées d'autres groupes » (Mayr 1942). Cette définition a été plus tard complétée par le fait que les individus doivent engendrer une descendance fertile. Ce dernier point (le fait que la descendance doit être elle-même fertile) est un point central de la définition. En effet, un des exemples les plus connus pour l'illustrer est l'exemple de l'hybridation entre un âne mâle et une jument qui donne un mulot (l'inverse sexuel donnant un bardot). Les parents ont pu s'hybrider mais leur descendance, mulot ou bardot, est stérile. Cependant cette définition, à la fois simple et efficace pour beaucoup d'organismes, n'est en fait pas universelle. Dans le règne végétal notamment, beaucoup de plantes d'espèces différentes peuvent s'hybrider et leur descendance (graines) est tout à fait viable et fertile. De surcroît, pour certains organismes, comme par exemple les bactéries, cette définition est totalement inutilisable de par l'absence de reproduction sexuée. D'autres facteurs sont pris alors en compte (comme le taux d'hybridation ADN/ADN par exemple) pour définir les espèces bactériennes.

De nos jours, les biologistes sont d'accord pour dire qu'une espèce correspond à des segments de lignées évolutives qui évoluent séparément les unes des autres (De Queiroz 1998, 2007; Mayden 1997). Dans la revue de De Queiroz en 2007, un tableau récapitulatif des principaux concepts d'espèces (biologique, écologique, phylogénétique) émis au travers d'études historiques est donné (Tableau 1). Selon ces mêmes auteurs, les autres concepts existants (non listés dans le

Tableau 1) ne seraient que des propriétés secondaires ; des conséquences de la définition d'espèce. En d'autres termes, ces concepts là seraient des outils pour délimiter des espèces et non pas des définitions en elles-mêmes. De Queiroz met en avant le fait que tous ces concepts convergent vers la définition unifiée qui dit qu'**une espèce correspond à une lignée évolutive évoluant séparément des autres** (Tableau 1).

Cependant, parmi tous ces concepts, quatre se démarquent et apparaissent régulièrement au travers de toutes les études (Giraud et al. 2008). Le premier est le **concept d'espèce biologique** (BSC = Biological Species Concept) qui est celui qui se rapproche le plus de la définition donnée par Mayr et qui s'intéresse à l'isolement reproductif. Il s'agit de l'impossibilité d'accouplement ou d'hybridation entre deux espèces différentes et donc ne conduisant pas à une descendance viable et féconde. Le deuxième concept est le **concept d'espèce morphologique** (MSC = Morphological Species Concept) qui s'intéresse aux divergences morphologiques. C'est le concept le plus empirique pour différencier deux espèces. Se ressemblent-elles ? Possèdent-elles des traits identiques ? C'est aussi un des concepts qui peut engendrer des erreurs d'homoplasie (Encadré 1). Le troisième concept est le **concept d'espèce écologique** (ESC = Ecological Species Concept). Celui-ci s'intéresse à l'adaptation d'une espèce à une niche écologique particulière. En effet, il a été avancé que deux espèces ne partagent pas des niches écologiques similaires de par les différences de préférences écologiques qu'elles possèdent. Cependant, il a été démontré qu'il peut y avoir des phénomènes de recouvrement de niches entre deux espèces différentes ce qui rend ce concept plus compliqué à utiliser dans certains cas.

Tableau 1: Grands concepts d'espèces et propriétés sur lesquelles ils sont basés.

(d'après De Queiroz 2007)

Concept d'espèce	Propriété(s)	Références
Biologique	Interfécondité (reproduction naturelle engendrant une descendance fertile et viable)	(Mayr 1942; Dobzhansky 1950; Wright 1940)
Isolement	*Isolement reproductif intrinsèque (absence d'interfécondité entre organismes hétérospécifiques basée sur des propriétés intrinsèques ; concept opposé aux propriétés extrinsèques (ex. barrières géographiques))	(Mayr 1942; Dobzhansky 1970)
Reconnaissance	*Système spécifique de reconnaissance sexuelle ou de fertilisation (mécanismes par lesquels des organismes conspécifiques ou leurs gamètes se reconnaissent entre eux pour s'accoupler et se fertiliser)	(Lambert and Spencer 1995 ; Masters et al. 1987; Paterson 1985)
Ecologique	*Niche écologique identique (tous les composants de l'environnement avec lesquels les organismes conspécifiques interagissent)	(Andersson 1990; Van Valen 1976)
Evolutif	Rôle et tendances évolutifs uniques	(Mayden 1997; Simpson 1951; Wiley 1978)
(quelques interprétations)	*Possibilité de diagnostic (qualitative, différence fixée)	(Grismer 1999, 2001)
Cohésion	Cohésion phénotypique (échangeabilité génétique ou démographique)	(Templeton 1989; Templeton 1998)
Phylogénétique	Hétérogène (voir les 4 points suivants)	(voir les 4 points suivants)
Hennigien	L'ancêtre s'éteint quand les lignées se séparent	(Hennig 1966; Meier and Willmann 2000; Ridley 1989)
Monophylétique	*Monophylie (groupe composé d'un ancêtre et de tous ses descendant ; communément inféré par la possession d'état de caractères dérivés partagés)	(Donoghue 1985; Mishler 1985; Rosen 1979)
Généalogique	*Coalescence exclusive d'allèles (tous les allèles d'un gène donné descendent d'un gène ancestral commun non partagé avec ceux d'autres espèces)	(Avice and Ball 1990; Baum and Shaw 1995)
Diagnosticable	*Possibilité de diagnostic (qualitative, différence fixée)	(Cracraft 1983; Nelson and Platnick 1981; Nixon and Wheeler 1990)
Phénétique	*Forme un groupe phénétique (différences quantitative)	(Michener 1970; Sneath and Sokal 1973; Sokal and Crovello 1970)
Groupe génotypique	*Forme un groupe génotypique (déficits en intermédiaires génétiques ; hétérozygotes)	(Mallet 1995)

Le dernier grand concept, le plus récent, est le **concept d'espèce phylogénétique** (PSC = Phylogenetic Species Concept) qui lui s'intéresse à la divergence nucléotidique. Lié au PSC, il existe le concept de reconnaissance d'espèce phylogénétique par concordance généalogique (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition, GCPSR) dont l'intérêt et la force résident dans la comparaison de plus d'une généalogie de gènes (Taylor et al. 2000). Le PSC est sans doute, parmi les quatre, le plus utilisé actuellement.

On a pu donc voir que la notion d'espèce n'est pas si facile à déterminer et l'utilisation de concepts permet de clarifier cette notion. Le dernier concept (PSC) est néanmoins le plus communément utilisé de nos jours lors d'études scientifiques. C'est certainement celui qui prend le mieux en compte l'aspect « évolutif » de la notion d'espèce dans sa définition moderne.

2. La notion d'écotype

Pour compléter cette réflexion sur la notion d'espèce, il est intéressant de se pencher sur la notion d'écotype. Cette notion a été développée en 1922 par Göte Turesson et est intimement liée à celle de l'espèce (Turesson 1922). **On parle d'écotype quand il s'agit d'une population d'une espèce vivante présentant des caractéristiques nouvelles adaptées à un type de milieu particulier.** Les caractéristiques propres à l'écotype sont héréditaires et peuvent avoir des conséquences morphologiques plus ou moins importantes. Un des exemples les plus connus est celui du gastéropode *Littorina saxatilis* (la littorine des rochers) qui présente plusieurs écotypes selon son habitat au sein d'une même localisation (Figure 3). Les différents morphes sont adaptés aux habitats respectifs (Johannesson 2003). D'autres exemples peuvent être cités comme chez la cyanobactérie *Prochlorococcus* (Moore et al. 1998), le caribou *Rangifer tarandus* (Courtois et al. 2003), les plantes

Spartina alterniflora (Poaceae) (Daehler et al. 1999) et *Galium spurium* (Rubiaceae) (Masuda and Washitani 1992) qui présentent des changements morphologiques en s'adaptant à leur milieu environnant.



Figure 3 : Variation d'écotypes de *Littorina saxatilis* représentée par les trois écotypes présents en Suède.

Les trois écotypes sont : l'écotype modérément exposé aux vagues au sein des rives de rochers (à gauche), l'écotype d'eaux saumâtres (lagunes, estuaires, marais salants) (au milieu) et enfin l'écotype exposé aux vagues sur les rochers (à droite). Les caractéristiques principales de l'écotype « modéré » est une taille importante, une coquille robuste et une ouverture relativement étroite. Ce morphe est adapté à la prédation des crabes notamment. L'écotype d'eaux saumâtres est en revanche plus petit, avec une coquille plus fine. Enfin le dernier écotype présente une coquille ramassée avec une ouverture arrondie adaptée à un environnement agité.

La notion d'écotype peut aussi être vue comme une étape intervenant dans le phénomène de spéciation. En effet, en reprenant le schéma de De Queiroz, en Figure 4, on peut voir que la spéciation est un phénomène continu (De Queiroz 2007). Il peut exister un état hybride, situé après le statut « une espèce » mais avant le stade « deux espèces », au cours duquel on ne sait pas très bien s'il y a deux espèces ou une seule. C'est dans cette zone que les différents concepts et les propriétés qui en découlent prennent place. La notion d'écotype peut aussi être une étape dans cette zone « floue » (zone grisée sur la Figure 4). Certains auteurs prennent la notion d'écotype comme synonyme de sous espèce ce qui traduit bien un état intermédiaire entre une seule espèce et deux espèces distinctes. Donc, on peut supposer qu'à un moment donné, trois cas sont possibles : (C1) une espèce (ligne rouge), (C2) deux espèces distinctes (ligne bleue) et (C3) *en spéciation* (ligne violette). Ce dernier cas peut avoir comme conséquence l'existence d'écotypes, de sous espèces.

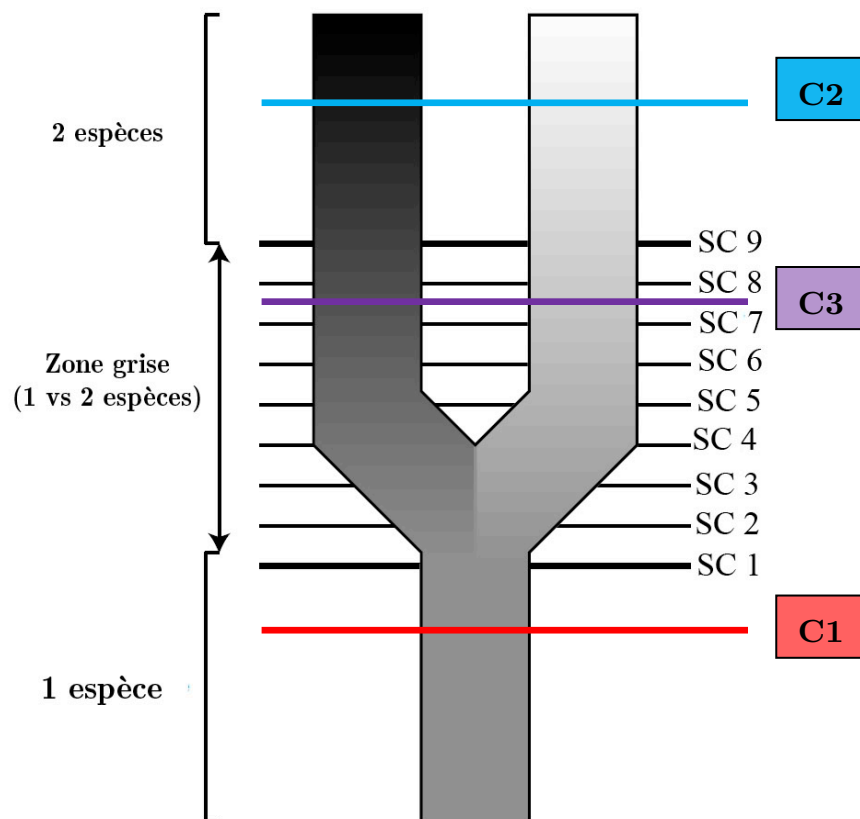


Figure 4 : Représentation simplifiée d'une lignée (espèce) se divisant pour former deux lignées (espèces).

Les dégradés de gris représentent les lignées filles qui divergent dans le temps. Les lignes horizontales notées « SC » (critères d'espèce) de 1 à 9 représentent les stades où elles acquièrent différentes propriétés (morphologiquement distinctes, monophylétiques, écologiquement distinctes ou encore incapables de se reproduire) (De Queiroz 2007).

Les lignes de couleurs ont été ajoutées ici pour montrer qu'à un moment donné, on peut être dans un des trois cas suivants : C1 : une seule espèce ; C2 : deux espèces distinctes et C3: *en spéciation*.

3. Le cas du règne fongique

Les quatre concepts donnés plus haut peuvent être utilisés chez les champignons mais c'est le **concept d'espèce morphologique qui a été le premier utilisé** car il est le plus empirique. En effet, pour différencier deux espèces fongiques, leurs particularités morphologiques telles que leurs carpophores (quand ils en forment), leurs spores et leurs mycéliums peuvent être utilisés. De nombreux ouvrages avec des clés de détermination utilisant des caractères morphologiques ont été écrits afin de pouvoir différencier des espèces fongiques entre elles (Courtecuisse 2007; Bon 2004).

Néanmoins, le **concept d'espèce biologique a pu être aussi utilisé chez les champignons**. En effet, dans une étude faite chez les Armillaires, les auteurs ont pu discriminer plus de 12 espèces biologiques alors que morphologiquement une seule espèce avait été identifiée (Anderson and Ullrich 1978).

Cependant, il ne fait aucun doute que le **concept d'espèce phylogénétique** (PSC) ainsi que le **concept de reconnaissance d'espèce phylogénétique** par concordance généalogique (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition, GCPSR) sont actuellement les plus utilisés dans le monde des champignons. De nombreuses études de taxonomie s'appuient sur les divergences nucléotidiques pour reconstruire l'histoire des gènes et de leur flux. En combinant plusieurs marqueurs génétiques, il est possible de reconstruire l'histoire des individus (Taylor et al. 2006).

Donc, actuellement, l'utilisation d'outils génétiques et d'autres critères comme la morphologie permet de reconstituer la phylogénie d'organismes fongiques et de préciser ou discuter la classification établie sur des critères morphologiques.

II. De la Phylogénie à la génétique des populations

A. Qu'est ce que la phylogénie ?

1. Définition

La phylogénie consiste à reconstruire des arbres représentant des relations de parenté supposées entre êtres vivants à partir d'observations sur un échantillonnage de taxons terminaux (espèce ou genre le plus souvent). Cela peut se faire sur des organismes actuels ou fossiles (Morlon et al. 2011; Quental and Marshall 2010). L'arbre phylogénétique est un ensemble de points de branchements. Chaque niveau est représenté par un nœud (Encadré 1 et Figure 5). Ce dernier représente un organisme théorique qui posséderait les synapomorphies (caractères dérivés communs à un ou plusieurs taxons) partagées par les nœuds postérieurs dans l'arbre phylogénétique. Les taxons peuvent être comparés à partir de différentes sources comme les protéines, l'ARN et l'ADN. Ce dernier de par sa facilité d'utilisation menant à l'obtention d'un grand nombre de caractères homologues, est un outil communément utilisé. Il faut cependant que les taxons étudiés soient assez bien conservés, notamment quand on dispose de spécimens anciens pour permettre l'extraction d'ADN. On parle alors de « phylogénie moléculaire ».

La phylogénie moléculaire, couplée avec l'informatique, a permis le développement de nouvelles méthodes d'analyses en faisant appel à des algorithmes complexes exécutés par des logiciels spécialisés. Les modèles d'évolution de séquences ont permis l'amélioration des méthodes de distance génétique. Ils ont été à l'origine du développement spectaculaire de l'application à la phylogénie des méthodes probabilistes ; maximum de vraisemblance et inférence bayésienne.

Lexique de Phylogénie	
ACPR :	Ancêtre Commun le Plus Récent. L'ACPR d'un groupe d'organismes est l'individu le plus récent duquel tous les organismes du groupe sont directement descendants.
Apomorphie :	C'est un caractère 'nouveau' , au sein d'un taxon, qui est le résultat d'une modification d'un caractère ancestral au cours de l'évolution précédant ce taxon. Ce caractère est commun à tout un groupe d'espèces et à leur espèce ancestrale. S'oppose à un caractère plésiomorphe qui n' a pas subi de modification au cours de l'évolution.
Branche :	Relation de parentés (ancêtre / descendants) entre les unités taxonomiques. Il existe des branches internes et externes.
Clade :	C'est un groupe monophylétique d'organismes vivants ou ayant vécu comprenant un organisme particulier et l'entièreté de ses descendants.
Gènes orthologues :	Gènes présents dans des organismes différents, ayant évolué à partir d'un même gène ancestral suite à des événements de spéciation
Gènes paralogues :	Gènes issus d'évènements de duplication au sein d'un génome
Groupe externe :	Taxon(s) externe(s) proches des UTO servant à enraciner l'arbre phylogénétique
Homoplasie :	Similitude d'un état de caractère chez différentes espèces qui, contrairement à l'homologie, ne provient pas d'un ancêtre commun. Il existe différents types d'homoplasie : la convergence, le parallélisme et la réversion.
Nœud :	Unité taxonomique. On distingue deux types de nœuds : les nœuds internes ou UTH (Unités Taxonomiques Hypothétiques) et les nœuds externes (ou feuilles) ou UTO (Unités Taxonomiques Opérationnelles)
Racine :	Elle définit un chemin évolutif unique de la racine vers chaque feuille. Elle symbolise le dernier ancêtre commun de toutes les UTO
Synapomorphie :	C' est un caractère dérivé (ou apomorphique), partagé par deux ou plusieurs taxons.
Taxon :	Rang taxonomique identifié, quelqu'en soit le niveau. Exemples : <i>Amanita caesarea</i> est un taxon de rang spécifique ; <i>Amanita</i> est un taxon de rang générique ; Amanitaceae est un taxon de rang familial ...

Encadré 1 : Lexique de Phylogénie

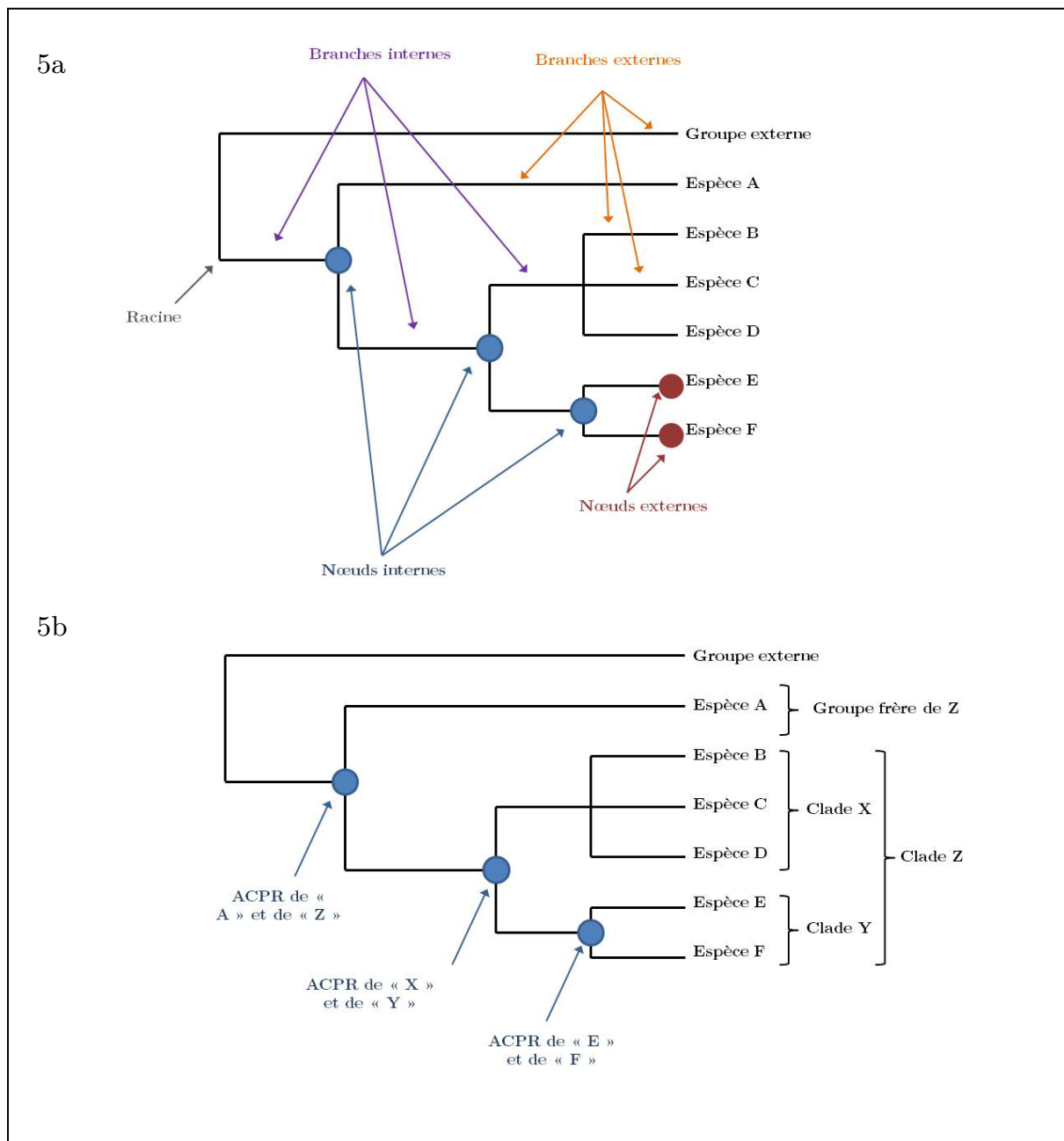


Figure 5 : Représentation schématique et simplifiée d'un arbre phylogénétique

(a) Les nœuds externes (ou unités taxonomiques opérationnelles) (en rouge) sont reliés aux nœuds internes (ou unités taxonomiques hypothétiques) par des branches (internes ou externes) qui représentent les relations de parentés « ancêtres/descendants ». (b) Un nœud interne est l'ancêtre commun le plus récent (ACPR) de tous les nœuds externe descendants de lui. Par exemple, le nœud interne le plus à droite sur le schéma 5b, est l'ACPR de l'espèce E et de l'espèce F.

2. Utilisation des méthodes de reconstruction probabilistes en phylogénie

Avant l'utilisation de méthodes de reconstruction probabilistes, différentes méthodes de reconstruction phylogénétique ont été utilisées. On peut citer notamment l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) et la méthode du Neighbour-Joining, toutes deux basées sur une matrice de distance génétique et la méthode de maximum de Parcimonie basée sur une méthode statistique non-paramétrique. Cependant, par la suite, se sont développées les méthodes dites probabilistes.

Le concept de vraisemblance (probabilité d'observer les données sous un certain modèle) est le fondement des méthodes dites probabilistes. Reportée en phylogénie, la vraisemblance est assimilée au vecteur de l'information phylogénétique qui est contenue dans les données. Deux grandes méthodes basées sur ce concept de vraisemblance ont vu le jour et ont été utilisées en phylogénie ; le maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne. La différence majeure entre ces deux méthodes est le fait qu'elles n'utilisent pas le même concept de probabilité. En effet, elles utilisent les mêmes modèles d'évolution de séquences mais n'utilisent pas la même analyse de probabilité. Ainsi, alors que le maximum de vraisemblance sélectionne l'arbre présentant la plus forte probabilité conduisant aux données (l'arbre qui maximise la vraisemblance), l'inférence bayésienne donne différentes probabilités de manière « *a priori* » aux différents arbres et réalise ensuite des inférences à partir de la distribution de ces probabilités « *a posteriori* » de ces arbres.

Les modèles d'évolution de séquences nucléotidiques, que ce soit en maximum de vraisemblance ou en inférence bayésienne sont les mêmes et sont explicites. Ils prennent en compte différents paramètres : le taux de substitution nucléotidique φ , les fréquences nucléotidiques π , l'hétérogénéité des taux Γ et les sites invariables I . (Figure 6). L'incorporation de ces modèles d'évolution de séquences permet d'estimer en même temps la phylogénie et le mode d'évolution des séquences. Pour choisir le modèle d'évolution le plus adéquat pour les données considérées, différents programmes ont été développés comme « ModelTest » (Posada and Crandall 1998) ou par la suite « jModelTest » (Posada 2008) et « PuMA » (Brown and ElDabaje 2009).

a) Maximum de vraisemblance

L'application de la méthode de maximum de vraisemblance à l'inférence de phylogénies a été proposée pour la première fois en 1967 par Cavalli-Sforza et Edwards (Cavallis and Edwards 1967). Mais c'est à partir des années 70 que les travaux de Felsenstein ont permis son développement (Felsenstein 1973). Durant ces périodes, le problème principal de la totale application et utilisation de cette technique de maximum de vraisemblance en phylogénie était le manque de technique en informatique. En effet, la méthode de maximum de vraisemblance a sensiblement été limitée par la puissance de calcul des ordinateurs existant à l'époque. Et ce n'est qu'au début des années 80 que ce problème fut débloqué par le développement des techniques informatiques. Mais c'est surtout le développement d'un nouvel algorithme par Felsenstein (le « pruning ») qui a permis de calculer pour un grand nombre de taxons, la vraisemblance à partir de leurs séquences nucléotidiques (Felsenstein 1981).

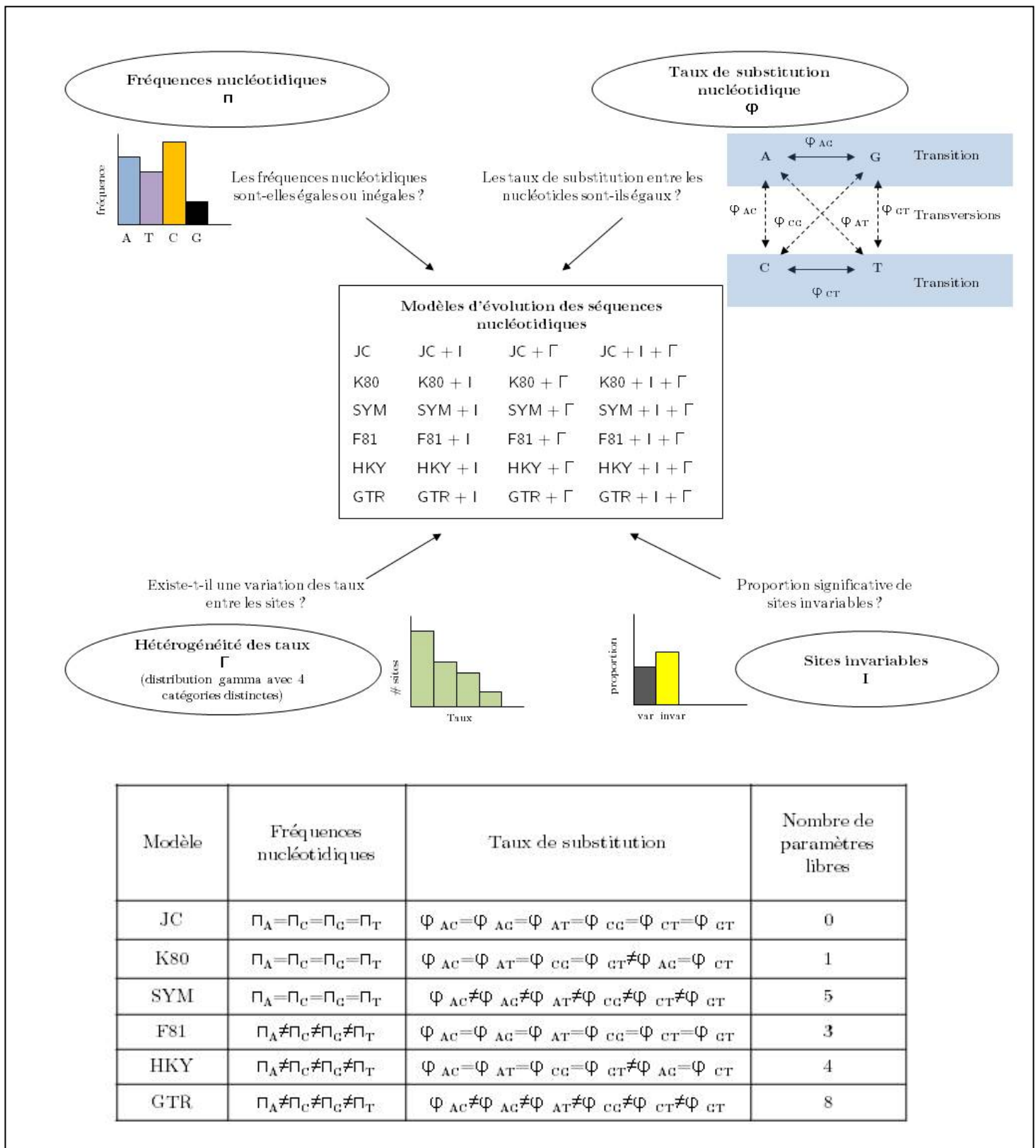


Figure 6 : Principaux modèles d'évolution de séquences nucléotidiques et leurs principaux paramètres.

Adapté de Posada et Crandall (2001) (Posada and Crandall 2001)

Le taux de substitution nucléotidique, les fréquences nucléotidiques, l'hétérogénéité des taux et les sites invariables sont les quatre paramètres qui définissent, selon leur état, le modèle d'évolution le plus approprié aux séquences nucléotidiques.

Le concept de maximum de vraisemblance se définit de façon simplifiée comme suit :

La vraisemblance L_x est la probabilité conditionnelle d'observer les données X (ici alignement de séquences par exemple) étant donné un arbre A (avec des longueurs de branches et une topologie donnée) :

$$L_x = \Pr (X | A)$$

Les données sont représentées par un alignement de séquences contenues dans une matrice M . Cette matrice comporte n taxons (lignes) et c sites (colonnes). On observe donc des cases s_{ij} qui correspondent à l'état nucléotidique du taxon i au site j :

$$M = [s_{ij}] = \begin{bmatrix} T & G & T & G & . & . & . & . & . & . & A & T & C \\ T & G & T & C & . & . & . & . & . & . & A & T & C \\ T & C & A & A & . & . & . & . & . & . & A & A & C \\ A & A & G & T & . & . & . & . & . & . & C & A & G \\ T & A & C & C & . & . & . & . & . & . & C & C & G \\ T & T & G & G & . & . & . & . & . & . & G & C & C \end{bmatrix}$$

Au sein de cette matrice, les sites s sont indépendants et sont notés $s_1 = (TTTATT)$, $s_2 = (GGCAAT)$, $s_3 = (TTAGCG)$ etc. etc....

On doit ensuite calculer la probabilité d'obtenir chaque site de l'alignement. La probabilité d'observer l'état des caractères (A, T, C ou G) pour un site donné dépend à la fois de la topologie de l'arbre, de ses longueurs de branches et du modèle d'évolution de ses branches. Ainsi le calcul de probabilité d'observer les données au site considéré est la somme des probabilités d'observer les différents états nucléotidiques possibles à ce site et à chaque nœud interne de l'arbre.

Cependant, si on considère un nombre de taxons supérieur à 10, on s'aperçoit que le nombre de combinaisons devient très vite énorme. C'est pour cela que cette somme se fait via l'algorithme développé par Felsenstein en 1981 (le « pruning ») qui permet de

tirer avantage dans son calcul de l'information topologique. De cette manière, la probabilité d'observer l'alignement de séquences est tout simplement le produit des probabilités des différents sites ; ce, bien sûr en admettant l'indépendance des différents sites du jeu de données. Cependant, ce produit donne généralement un nombre très petit (car on multiplie des probabilités entre elles, donc des nombres <1). On utilise alors le logarithme de vraisemblance pour obtenir des valeurs interprétables et plus facilement utilisables en informatique. La vraisemblance de l'alignement des séquences devient ainsi la somme des logarithmes des vraisemblances aux différents sites de l'alignement.

Lors de l'utilisation du maximum de vraisemblance en phylogénie, on incorpore la technique dite de « bootstrap », ou ré-échantillonnage en français afin de vérifier la robustesse de l'arbre. La technique de bootstrap consiste à recréer un jeu de données aléatoire par ré-échantillonnage numérique à partir du jeu de données réel. Un arbre phylogénétique est construit pour chaque jeu de données créé et la proportion de ces arbres obtenus par « bootstrap » et montrant un même regroupement phylogénétique est comptée. On obtient ainsi un « pourcentage de bootstrap » traduisant un niveau de confiance vis-à-vis de la branche considérée de l'arbre (du regroupement phylogénétique donné).

Les programmes de phylogénie incorporant la méthode de maximum de vraisemblance sont nombreux. On peut citer les plus connus tels que « PHYLIP » (Felsenstein 2005), « fastDNAm1 » (Olsen et al. 1994), « PhyML » (Guindon et al. 2010) et « RAxML » (Stamatakis 2006).

b) Inférence bayésienne

Comme son nom l'indique, l'inférence bayésienne a pour point de départ le théorème de Bayes développé par le scientifique du même nom et communiqué à titre posthume par son ami Price (Bayes and Price 1763). Cette méthode d'inférence statistique est donc assez ancienne mais elle n'a été utilisée en reconstruction phylogénétique qu'en 1996 par trois groupes menant des études indépendamment les uns des autres (Rannala and Yang 1996; Li 1996; Mau 1996).

Dans cette méthode, on considère la probabilité postérieure qui est la probabilité de l'hypothèse H sachant les données X :

$$\text{Pr} (H | X).$$

Ceci est différent du maximum de vraisemblance où, comme nous l'avons vu plus haut, l'on cherche la probabilité des données D sous une hypothèse X :

$$\text{Pr} (D | X).$$

Cette probabilité postérieure d'une hypothèse peut être donc calculée via le théorème de Bayes. Incorporée en phylogénie, l'inférence bayésienne combine la probabilité *a priori* $\text{Pr} (A)$ d'un arbre A avec la vraisemblance $\text{Pr} (X | A)$ des données X sachant cet arbre A pour produire une distribution de probabilité postérieure $\text{Pr} (A | X)$ sur les arbres en utilisant la formule de Bayes.

La probabilité postérieure d'un arbre pouvant être interprétée comme la probabilité que cet arbre soit vrai sachant les données, les inférences sont réalisées à partir de la distribution de probabilité postérieure des différents arbres évalués au cours de l'analyse.

Le calcul de $\Pr (A \mid X)$ étant généralement impossible, on utilise une technique impliquant les chaînes de Markov avec technique de Monte Carlo (MCMC) qui permettent de générer un échantillon de la distribution *postérieure* des topologies d'arbres. L'idée des MCMC est qu'une chaîne de Markov joue le rôle d'une marche aléatoire guidée à travers tout l'espace multidimensionnel des différents paramètres. Elle est utilisée pour estimer une distribution de probabilités en échantillonnant les valeurs de ces paramètres de façon périodique. Plus le nombre de pas effectués par cette chaîne est important, plus l'approximation de la distribution sera exacte (Lewis 2001). On génère un échantillon de plusieurs dizaines de milliers d'arbres qui suit la distribution de probabilité $\Pr (A \mid X)$. Au final, l'expression des résultats se traduit par un arbre consensus indiquant la probabilité postérieure de ses clades et la fraction des arbres échantillonnés contenant chaque clade.

Les méthodes de maximum de vraisemblance et d'inférence Bayésienne sont de nos jours les plus utilisées en phylogénie et de nombreuses études combinent les deux approches pour pouvoir obtenir deux arbres et regarder si leurs topologies se superposent. Et si on compare l'évolution des différentes méthodes de reconstruction phylogénétiques à travers les décennies, on s'aperçoit d'ailleurs que la méthode de parcimonie longtemps utilisée s'est faite récemment dépasser par l'inférence bayésienne et le maximum de vraisemblance. (Figure 7).

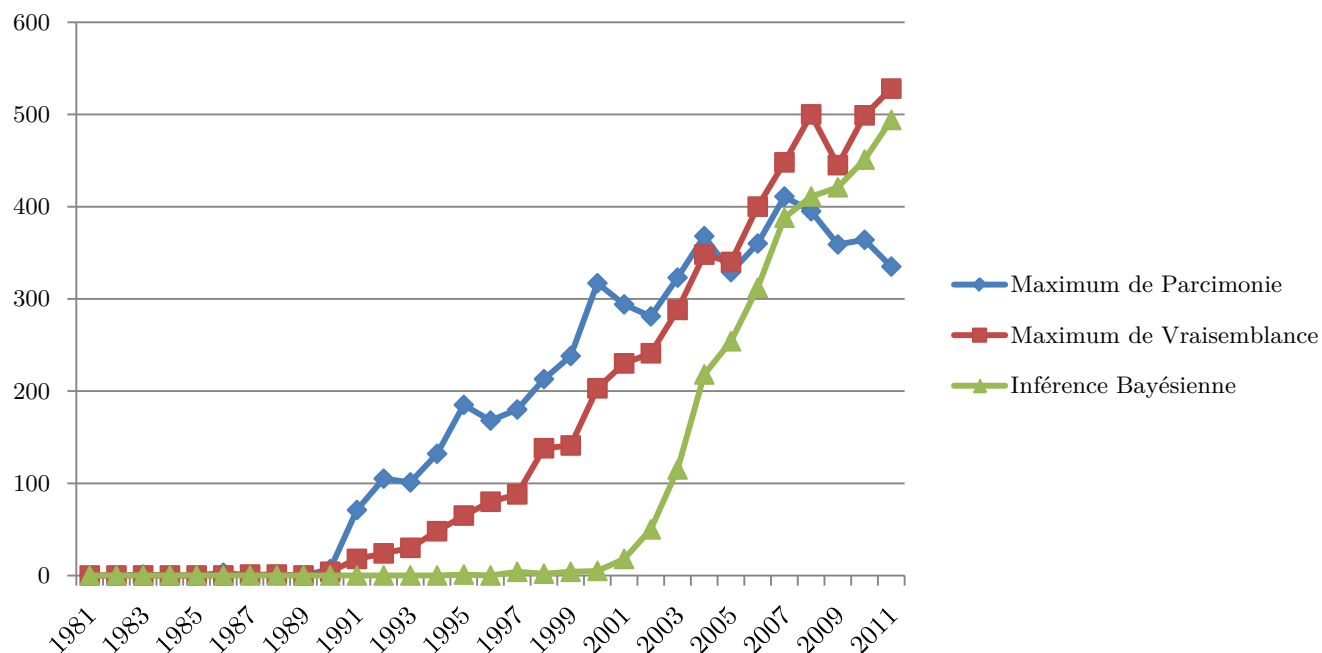


Figure 7 : Evolution de l'utilisation des trois méthodes de reconstruction phylogénétique ; le maximum de parcimonie, le maximum de vraisemblance et l'inférence bayésienne depuis l'article de Felsenstein en 1981.

Le nombre de publications correspond au nombre de publications référencées par an sur la base de données de Web of Science® (<http://apps.webofknowledge.com.gate1.inist.fr/>) contenant les mots clés : « Phylogeny » et « Parsimony », « Phylogeny » et « Likelihood » et « Phylogeny » et « Bayesian »

B. Génétique des populations d'une espèce et phylogéographie

1. *La génétique des populations*

Le terme « population » désigne un ensemble d'individus appartenant à la même espèce qui se trouvent au même endroit au même moment (Encadré 2). La population est l'unité de base en génétique des populations. Le principe de génétique des populations consiste en l'étude de fréquences alléliques des individus choisis et donc en l'étude de leur diversité génétique. La génétique des populations s'intéresse aux fluctuations existantes de ces fréquences au sein des différentes populations étudiées mais aussi entre ces dernières. Les marqueurs génétiques sont les fondements qui permettent l'obtention de cette diversité et donc l'utilisation des méthodes de génétique des populations permettent de mettre en exergue les processus évolutifs qui ont conduit ou non à une structuration génétique de ces populations. Comme énoncé plus tôt, ces processus évolutifs sont au nombre de cinq : la dérive génétique, la sélection, la mutation, la migration (les flux de gènes) et la recombinaison. Selon les organismes et les cas étudiés, chacun de ces processus évolutifs joue un rôle plus ou moins important. Leur action opère directement sur l'établissement, la persistance ou l'absence de structure génétique. Pour inférer l'histoire évolutive et donc étudier la possible structuration génétique d'un organisme, différents marqueurs ont été utilisés et sont toujours utilisés à ce jour.

Lexique de Génétique des Populations	
Effet Walhund:	C'est un excès d'homozygotes (ou un déficit en hétérozygotes) par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg qui traduit la subdivision de la population étudiée en plusieurs populations qui n'échangent pas ou peu de gamètes.
Equilibre d'Hardy-Weinberg :	Théorie qui postule qu'au sein d'une population (idéale), il y a équilibre des fréquences allélique et génotypique d'une génération à l'autre
Panmixie :	Principe qui considère que les individus sont répartis de manière homogène au sein de la population et se reproduisent tous aléatoirement.
Polymorphisme :	Désigne la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donnés, dans une population
Population :	Ensemble d'individus d'une même espèce vivante se perpétuant dans un territoire donné

Encadré 2 : Lexique de génétique des populations

2. La phylogéographie

Le terme « phylogéographie » a été défini pour la première fois en 1987 par Avise et ses collaborateurs dans une étude portant sur l'ADN mitochondrial (Avise et al. 1987). **La phylogéographie a pour objectifs principaux d'étudier l'histoire des populations d'une espèce d'un point de vue généalogique et géographique, mais aussi de comprendre quels sont les processus qui peuvent conduire aux différentes structures actuelles, tant au plan géographique que génétique.** Les fluctuations climatiques peuvent influencer la phylogéographie d'une espèce donnée, du fait, par exemple, d'isolements géographiques temporaires des populations, conséquences des modifications de la distribution des biotopes dans le temps.

Une des dernières fluctuations climatiques majeures a été la dernière période glaciaire. Elle s'est étendue, au Quaternaire, de -120.000 à -10.000 ans avant nos jours et correspond au Pléistocène supérieur. La période interglaciaire de l'Holocène commencée il y a 10.000 ans se poursuit de nos jours. Selon Hays et al. (1976), ces cycles glaciaires/interglaciaires seraient dus à l'inclinaison de la Terre (Hays et al. 1976). Cette dernière période glaciaire a eu des conséquences importantes sur la taille de la calotte glaciaire, qui s'est étendue vers le Sud, et donc sur la distribution des différents habitats et des espèces associées. Ces fluctuations climatiques ont pu conduire à des changements de la répartition des espèces au cours du temps.

Ces caractéristiques font de l'Europe un modèle de choix en phylogéographie. A partir de ce modèle, des hypothèses sur les zones de refuges glaciaires du Quaternaire et les voies de recolonisations post-glaciaires peuvent être proposées et testées. Beheregaray en 2008, dans un article de synthèse de 20 ans d'études en phylogéographie, met en évidence qu'une grande partie des études phylogéographiques s'est faite sur l'hypothèse des refuges européens (Beheregaray 2008). Dans la majorité des cas, les espèces ont été contraintes à se réfugier vers le Sud de l'Europe. Ce dernier est constitué de péninsules (ibérique, italienne et balkanique) qui ont favorisé l'isolement des populations qui les ont colonisées. Ces zones sont appelées des « zones refuges ». Cependant, les réponses face aux changements climatiques diffèrent en fonction des préférences écologiques des espèces, comme par exemple la tolérance au froid ou une exploitation de nombreuses niches écologiques (espèces à large aire de répartition) (Schmitt and Haubrich 2008; Schmitt et al. 2007; Dépraz et al. 2008).

III. Les outils moléculaires en phylogénie et génétique des populations

A. Outils utilisés en phylogéographie et génétique des populations ?

Pendant de nombreuses années, les données fossiles étaient la source principale pour inférer l'histoire des populations d'espèces (Coope 1979). Puis, avec la révolution des outils de biologie moléculaire et le nombre important de marqueurs accessibles, il a été plus facile de générer des données dans le but d'inférer l'histoire des populations. Cependant, l'interprétation n'en reste pas moins délicate. Par conséquent, se pose la question cruciale du choix des outils méthodologiques et des marqueurs à utiliser pour répondre au mieux aux hypothèses posées.

Chronologiquement, le premier outil de biologie moléculaire utilisé pour une étude de phylogéographie a été la technique « RFLP » (Restriction Fragment-Length Polymorphism) (Avice et al. 1979). Il est intéressant de noter, que le terme « phylogéographie » n'est pas employé dans l'article d'Avice et collaborateurs, car, comme évoqué précédemment, il ne sera développé qu'en 1987 par ce même auteur (Avice et al. 1987). Cette technique, ainsi que celles des allozymes (Schmitt and Haubrich 2008), ne révèle que peu de polymorphisme. Par ailleurs, le marqueur « allozymes » est potentiellement soumis à sélection. Ces techniques ont été largement supplantées par le séquençage direct de l'ADN, notamment l'ADN mitochondrial (ADNmt) ou chloroplastique (Dépraz et al. 2008; Horn et al. 2006; Cheddadi et al. 2006). Bien que leur transmission soit monoparentale et ne rende

compte de l'histoire que d'un seul sexe, leurs taux d'évolution rapides en font des outils puissants en phylogéographie, où l'échelle de temps considérée est relativement courte. Actuellement, les marqueurs microsatellites (Rossiter et al. 2007) ou les AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism), *a priori* neutres, sont des outils privilégiés pour les études phylogéographiques, puisqu'ils permettent de révéler un important polymorphisme. Cependant, un risque d'homoplasie peut exister, conduisant à une sous-estimation du polymorphisme par rapport au séquençage (Hewitt 2004). L'utilisation d'un seul marqueur est souvent insuffisante pour refléter correctement les liens de parenté entre populations, puisqu'il ne reflètera que son histoire propre (Arango and Wheeler 2007). Des outils moléculaires performants nous permettent de répondre aux questions liées à la phylogéographie d'une espèce, mais certaines erreurs qu'elles soient méthodologiques ou liées à des événements tels que l'introggression ou l'infection bactérienne peuvent perturber les conclusions ou même entraîner de fausses conclusions (Avisé 2009). Nous allons détailler ici quelques uns de ces problèmes et la manière d'y remédier.

B. Biais possibles en phylogéographie et génétique des populations

1. Biais méthodologiques

En ce qui concerne les biais et erreurs que l'on peut rencontrer au niveau de la collecte des données, Pompanon *et al.* (2005) ont défini quatre groupes d'erreurs majeures et les biais qui peuvent en découler : (i) les erreurs liées à la séquence d'ADN elle-même, (ii) celles dues à une mauvaise qualité et quantité d'ADN (par exemple ADN dégradé des fèces (Lathuillière et al. 2001) ou l'utilisation d'ADN

ancien), (iii) les artefacts biochimiques et (iv) enfin les erreurs humaines (Tableau 2). Cette liste n'est sûrement pas exhaustive mais donne une idée de la masse d'erreurs potentielles qui peut exister dans une étude de génétique des populations et de phylogéographie.

Tableau 2: Classification des erreurs de données de marqueurs microsatellites selon leur cause principale.

(d'après Pompanon et al., 2005) Allèle Nul : Allèle non amplifié du à une mutation dans la séquence de l'amorce. Allèle Perdu : Conséquence d'une amplification aléatoire d'un allèle sur deux pour un hétérozygote. Allèle Erroné : Allèle qui ne correspond pas au véritable allèle

Causes de l'erreur		Mécanisme?	Conséquence de cette erreur pour le génotype
<u>Interactions entre les molécules d'ADN</u>	Séquence d'ADN flanquante au marqueur	Pas ou peu d'amplification à cause d'une mutation dans la séquence de l'amorce	Allèle Nul
	Séquence d'ADN flanquante au marqueur	Insertion ou Deletion dans le fragment amplifié	Homoplasie de différents allèles
	Séquence d'ADN flanquante au marqueur	Pour les individus hétérozygotes, amplification préférentielle d'un allèle (du à un faible contenu en GC => dénaturation favorisée)	Perte d'un allèle sur deux
<u>Qualité de l'échantillon</u>	Faible qualité ou quantité d'ADN	Amplification d'un allèle pour les hétérozygotes	Perte d'un allèle sur deux
	Contamination de l'ADN extrait	Amplification d'allèles contaminants	Allèle Erroné
<u>Artefacts biochimiques et techniques</u>	Faible qualité des réactifs	Détection faible du fragment	Allèle Erroné et/ou Perdu
	Erreurs de Taq Polymerase	Glissement lors de la première étape de la PCR	Mauvais Allèle
	Manque de spécificité	Amplification de produits non-spécifiques	Allèle Erroné
<u>Facteur Humain</u>	Manipulation de l'échantillon	Confusion entre les tubes	Allèle Erroné
	Erreur expérimentale	Protocole non suivi	Perte d'allèles ou même Allèles erronés
	Manipulation des données	Mauvaise lecture des résultats, données et profils	Allèle Erroné

De plus, parmi les erreurs méthodologiques possibles, existe le biais dans la lecture des génotypes. En effet, des erreurs de génotypages peuvent modifier l'interprétation comme par exemple l'identification de faux homozygotes, ce qui a une conséquence, notamment en terme de filiation (Gagneux et al. 1997).

2. Biais d'interprétation :

En phylogéographie, comme dans toute étude écologique, l'échantillonnage est primordial : il doit rendre compte de l'ensemble de l'aire de distribution et des biotopes de l'espèce. En effet, les zones non échantillonnées, les « trous géographiques », pourraient être importantes lors de l'interprétation des résultats. Par exemple, si l'échantillonnage est effectué dans une zone refuge potentiel ainsi que dans une zone de contact mais aucun dans les régions intermédiaires (possibles voies de colonisation menant à la zone de contact), les données génétiques ne permettraient pas par exemple d'identifier correctement la zone refuge. Par ailleurs, les approches utilisées et plus particulièrement les marqueurs choisis sont également sources d'erreurs. Par exemple, l'ADNmt, marqueur le plus utilisé en études phylogéographiques, du fait de sa transmission monoparentale, rend compte de l'histoire d'un seul sexe. Il a donc sa propre histoire et donne une vision partielle de l'information démographique. De plus, le phénomène d'insertion nucléaire (copies du génome mitochondrial dans le génome nucléaire) peut être rencontré lors de l'analyse de séquences d'ADNmt. Ces copies, paralogues non fonctionnelles (Encadré 1), peuvent être amplifiées et interprétées comme des séquences mitochondriales. Enfin, l'incompatibilité cytoplasmique (phénomène de « male-killer ») peut également donner lieu à un biais d'interprétation en ne tenant compte de manière privilégiée que de l'histoire de l'un des deux sexes et non pas de l'espèce (Hurst and Jiggins 2005). Enfin, l'introggression de gènes peut donner l'apparence d'une différenciation génétique entre populations (Shaw 2002). C'est un phénomène naturel de transfert de gènes d'une espèce à une autre qui se produit par hybridation interspécifique suivie de croisements successifs avec les populations parentales.

C. Comment peut-on éviter ces biais ?

Sans vouloir faire une liste exhaustive des manières d'éviter des biais dans une étude phylogéographique ou de génétique des populations, on peut tout de même citer des points principaux pouvant aider sinon à les exclure au moins à les minimiser.

1. *Biais méthodologiques :*

Les estimations de taux d'erreurs sont possibles aux niveaux alléliques, locus ou même multi-loci. Après définition d'un génotype de référence, le génotype de chaque individu est comparé au génotype de référence afin de calculer les mésappariements (Bonin et al. 2004; Pompanon et al. 2005). Ainsi, on peut se rendre compte de l'existence de génotypes peu fiables par exemple des faux homozygotes. Ce type d'approche est couramment employé pour l'étude d'ADN dégradé issu de fèces (Lathuillière et al. 2001). Bonin et ses collaborateurs avancent même que le taux d'erreur pourrait être pris comme moyen pour évaluer la qualité des données (Bonin et al. 2004). Toute déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans une population panmictique (définitions en Encadré 2) pourra être l'indicateur de la présence d'allèles nuls ou de faux homozygotes, par exemple. Egalement, un biais d'échantillonnage (effet Wahlund-définition en Encadré 2) conduira aux mêmes effets. La non connaissance des systèmes de reproduction pour une espèce donnée, peut également conduire à des difficultés d'interprétation d'un déséquilibre observé de Hardy-Weinberg (par exemple : la consanguinité).

2. *Biais d'interprétation :*

- échantillonnage : Comme évoqué ci-dessus, l'effort d'échantillonnage est important dans toute étude scientifique et notamment en phylogéographie, discipline qui veut inférer l'histoire des populations. Il faut donc que l'échantillonnage soit le plus

exhaustif possible tant en sites d'échantillonnage qu'en nombre d'individus par site. En pratique et selon le modèle biologique, cela peut être assez compliqué.

- approche multi-loci : Etant donné que chaque marqueur reflète son histoire propre, l'idéal sera de coupler différents marqueurs et si possible en utilisant des loci communs à tous les individus (autosomes et chromosome X) mais aussi spécifiques aux lignées paternelles et maternelles (microsatellites du Y, séquences ADNmt par exemple). En effet, inférer l'histoire d'un gène ou d'un marqueur n'est pas inférer l'histoire de l'espèce. L'approche multiloci permettra de séparer les effets propres aux loci (tels que sélection, mutation, recombinaison) de ceux qui affectent l'ensemble du génome de manière identique comme la dérive génétique, l'histoire démographique des populations, la migration et la consanguinité (Black et al. 2001). L'utilisation d'un grand nombre de marqueurs strictement neutres améliore nécessairement l'estimation des paramètres démographiques et permettra de mieux comprendre l'histoire phylogéographique de l'espèce considérée. Des paramètres tels que la taille efficace des populations, les taux de migration et les distances génétiques entre populations sont ainsi mieux estimés puisque l'on réduit la variance associée au processus généalogique de chaque locus et à l'effet de biais généré par les processus de sélection. Le couplage de plusieurs marqueurs permettra également d'éviter les problèmes liés à l'introggression, en particulier une introgression qui serait unidirectionnelle ou uni-sexe, comme cela a été montré entre le macaque rhésus et le macaque à longue queue (Bonhomme et al. 2009).

Dans la prochaine partie, les marqueurs microsatellites ainsi que les techniques utilisées pour les isoler et les développer seront plus précisément évoqués.

D. Les marqueurs microsatellites

1. *Que sont les marqueurs microsatellites et quel est leur intérêt?*

Les microsatellites (ou Simple Sequence Repeats (SSR) en anglais) sont des courtes séquences d'ADN répétées en tandem d'un court motif nucléotidique (1 à 6 nucléotides) (Queller et al. 1993). Ils peuvent être classés en fonction du type de répétition (Encadré 3) (Urquhart et al. 1994).

Les différents types de marqueurs microsatellites	
Microsatellites dits « parfaits »	$CA_{(n)}$
Microsatellites dits « imparfaits »	CAGCTCAGCTACAGCCAGCACAGC
Microsatellites dits « composés juxtaposés »	$CA_{(n)}GA_{(m)}$
Microsatellites dits « composés interrompus »	$CA_{(n)}N_1GA_{(m)}$ avec $N_1 < 4$
Microsatellites mononucléotidiques	$A_{(n)}$ ou $C_{(n)}$...
Microsatellites dinucléotidiques	$AT_{(n)}$, $CT_{(n)}$, $CG_{(n)}$...
Microsatellites trinuécléotidiques	$ACT_{(n)}$, $CCT_{(n)}$, $CGG_{(n)}$...
Microsatellites tetranucléotidiques	$AGCT_{(n)}$, $CACT_{(n)}$, $CTGG_{(n)}$...
Microsatellites pentanucléotidiques	$AGACT_{(n)}$, $CTACT_{(n)}$...
Microsatellites hexanucléotidiques	$AAGACT_{(n)}$, $CATACT_{(n)}$...

Encadré 3 : Les différents types de marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites se trouvent dispersés dans le génome nucléaire et sont présents chez tous les organismes connus à ce jour. Sur le génome eucaryote, ils sont plus ou moins uniformément répartis quoique sous-représentés au niveau des régions codantes et peut-être des télomères (Goldstein and Schlöterer 1999). Alors que le taux de substitution moyen dans une séquence est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} par locus et par génération, il peut atteindre chez les microsatellites des plantes, 10^{-2} à 10^{-3} pour les séquences nucléaires (Kovalchuk et al. 2000; Udupa and Baum 2001) et 10^{-5} pour les séquences chloroplastiques (Provan et al. 2001). Les mécanismes de mutation évoqués sont principalement des glissements de la polymérase lors de la réplication de l'ADN et de crossing-over inégaux (Levinson and Gutman 1987), provoquant d'importants polymorphismes de longueur (Jarne and Lagoda 1996). Des modèles de mutation, différents du modèle traditionnel en nombre infini d'allèles (Infinite Allele Model, IAM.) ont été construits pour rendre compte de ce polymorphisme de longueur. On peut citer par exemple le modèle « pas à pas » (Stepwise Mutation Model, SMM), où chaque nouvelle mutation ajoute ou élimine un motif nucléotidique. Le fait que les marqueurs microsatellites soient, comme énoncé précédemment, hautement polymorphes les rend tout à fait adéquats pour caractériser la structure génétique des populations et appréhender les phénomènes évolutifs récents (Provan et al. 2001; Varshney et al. 2005). Ils sont très utiles pour une multitude d'applications grâce à leur aptitude à se transmettre à la descendance, leur nature multiallélique, leur caractère codominant, leur relative abondance et leur bonne couverture du génome (Varshney et al. 2005). On les retrouve en médecine légale et criminelle, pour établir des cartes génétiques, en biologie de la conservation et en génétique des populations. Ces dernières années, une multitude d'études a utilisé les marqueurs microsatellites et ces derniers sont devenus des marqueurs de référence en biologie évolutive (Figure 8).

Les études impliquant les SSR n'ont cessé d'augmenter depuis ces dernières années, surpassant pour le moment les études impliquant les polymorphismes d'un simple nucléotide, les « SNP » (Single-Nucleotide Polymorphism) mais très prochainement, la tendance devrait s'inverser (Guichoux et al. 2011).

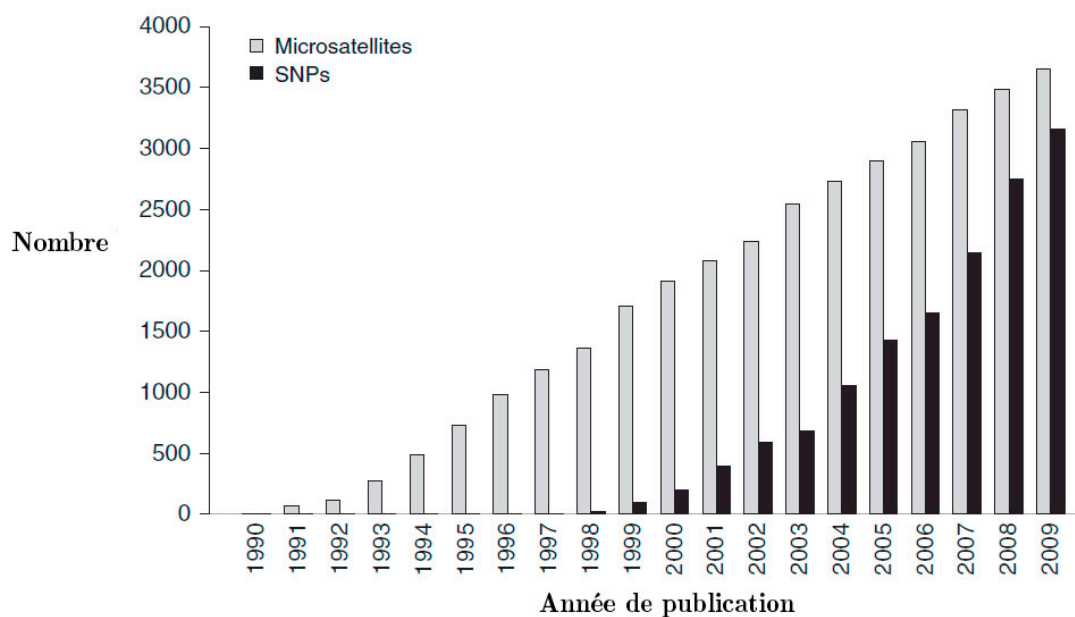


Figure 8 : Evolution du nombre d'études citant l'emploi de marqueurs SSR et SNP depuis 1990 tous règnes du vivant confondus

(Guichoux et al. 2011). L'emploi de marqueurs SSR a augmenté de manière linéaire depuis les années 1990 alors que pour les marqueurs SNP, l'augmentation s'est fait de manière exponentielle. D'ailleurs, l'emploi de marqueurs SNP devrait surpasser celui de marqueurs SSR très prochainement.

2. Identification et développement de marqueurs microsatellites spécifiques

L'identification et le développement des marqueurs microsatellites sont de véritables challenges. C'est surtout vrai pour les organismes pour lesquels peu de données de séquences sont disponibles. En effet, pour les espèces dont le génome est connu, il est tout à fait facile d'identifier des marqueurs microsatellites par approche *in silico* (Lim et al. 2004; Murat et al. 2011; Toth et al. 2000). En pratique, malgré une évolution de plus en plus rapide du fait de l'existence de nouvelles techniques efficaces de séquençage de génome, peu d'organismes eucaryotes ont des séquences génomiques connues et disponibles sur les bases de données. Une alternative au développement de marqueurs microsatellites spécifiques est l'utilisation de marqueurs développés sur une espèce proche et donc d'effectuer des amplifications croisées (« cross-amplification ») avec plus ou moins de mises au point importantes. Cependant, il a été montré que selon les organismes utilisés, et même quelquefois au sein du même genre, les cross-amplifications pouvaient ne pas fonctionner (Barbara et al. 2007). De ce fait, dans un grand nombre de cas, les marqueurs microsatellites doivent être développés *de novo* pour chaque espèce.

3. Quels moyens pour développer des SSR spécifiques ?

L'isolement et le développement de marqueurs microsatellites peuvent se faire de différentes manières qui ont évolué au fur et à mesure de l'avancée des moyens techniques. En 2002, Zane et collaborateurs ont synthétisé les différentes techniques de l'époque pour isoler et développer des marqueurs microsatellites (Zane et al. 2002).

Chronologiquement, le moyen traditionnellement employé était l'isolement à partir d'une banque (library) génomique partielle de l'organisme cible (Rassmann et

al. 1991). L'ADN génomique est fragmenté soit en utilisant des enzymes de restriction soit plus rarement par sonication. Les fragments d'ADN sont alors ligués dans un vecteur plasmidique commun soit directement, soit après une étape de ligation avec des adaptateurs spécifiques. S'en suit une étape de transformation bactérienne et de clonage. Les clones positifs sont ensuite identifiés par criblage à l'aide d'une hybridation Southern utilisant des sondes contenant les motifs répétés des marqueurs microsatellites ciblés. Les clones positifs sont ensuite séquencés. Après séquençage, des amorces spécifiques des marqueurs microsatellites isolés sont développées. Une approche un peu différente qui permet d'éviter toutes les étapes depuis la fragmentation de l'ADN jusqu'au clonage a été mise au point à partir de ce protocole en 1999 par Lunt et collaborateurs. Il s'agit de l'approche PIMA (PCR Isolation of Microsatellite Arrays) qui fait entrer dans le protocole une étape d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe : la RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Lunt et al. 1999). D'autres auteurs, eux aussi pour éviter la construction de banques et l'étape de criblage, ont développé des techniques parallèles basées par exemple sur la RAPD mais leur usage n'a pas été si fréquent (Cifarelli et al. 1995; Richardson et al. 1995; Wu et al. 1994). Parallèlement, une autre stratégie a été proposée par d'autres auteurs pour construire des banques enrichies en marqueurs microsatellites. Cette technique est basée sur une extension d'amorces (Ostrander et al. 1992; Paetkau 1999). Enfin un groupe de techniques d'isolement de marqueurs microsatellites a été développé sur le principe de l'hybridation sélective (par méthode d'enrichissement de biotine par exemple) (Armour et al. 1994; Karagyozev et al. 1993; Kijas et al. 1994). Zane et collaborateurs, en 2002, après avoir passé en revue les techniques existantes, présentent une nouvelle technique qu'ils ont mis au point ; la technique FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats) (Zane

et al. 2002) qui comporte une étape de réaction extrêmement efficace de digestion-ligation de l'AFLP.

Toutes les techniques présentées qu'elles soient basées sur le même procédé ou pas ont toutes un point commun : le séquençage final par méthode de Sanger. Or, même si certaines permettent un gain de temps et de coût dans leur protocole, le séquençage traditionnel reste onéreux.

Ces dernières années, avec l'avancée des techniques de séquençage nouvelle génération, l'isolement et le développement des marqueurs microsatellites se sont fait via le pyroséquençage direct. En fait, certains auteurs ont combiné l'approche traditionnelle de banques enrichies et les nouvelles techniques de séquençage haut débit (pyroséquençage) pour développer plus rapidement des marqueurs microsatellites. C'est le cas notamment de Malausa et collaborateurs qui en 2011 ont optimisé le protocole traditionnel d'enrichissement de biotine de Kijas (Kijas et al. 1994) puis ont utilisé le pyroséquençage 454 pour développer des amorces spécifiques ; initialement sur l'abeille (*Apis mellifera*) puis sur 13 autres organismes (Malausa et al. 2011). Depuis cette étude, différents auteurs ont appliqué la même stratégie (banques enrichies + séquençage haut débit) afin de développer rapidement et efficacement des marqueurs microsatellites (Debout et al. 2012; Foulongne-Oriol et al. 2012; Micheneau et al. 2011; Reid et al. 2012; Von der Schulenburg et al. 2001).

Cependant même si le principe de séquençage haut débit permet une amélioration dans l'obtention de séquences contenant des marqueurs microsatellites, ces protocoles nécessitent le développement de banques enrichies qui sont gourmandes en temps et quelquefois donnent des résultats plus ou moins satisfaisants. Pour pallier à ces problèmes, depuis ces quatre dernières années, une nouvelle stratégie a vu le

jour qui repose sur le séquençage haut débit mais par approche directe de séquençage génomique ; le direct shotgun pyrosequencing.

4. Application du Direct Shotgun Pyrosequencing au développement de marqueurs microsatellites.

On appelle « Direct Shotgun Pyrosequencing » une technique de séquençage nouvelle génération qui permet d'obtenir rapidement des fragments de génome et donc d'isoler rapidement des marqueurs microsatellites. L'ADN génomique est directement séquencé par pyroséquençage sans passer par l'enrichissement de banques par exemple.

Mais, tout d'abord, qu'appelle-t-on « pyroséquençage » et quel en est le principe général ? Cette technique est de loin la technique « non Sanger » qui a connu le plus de succès ces dernières années. Le pyroséquençage d'ADN a été initié en 1988 par Hyman qui a pour la première fois mis au point un séquençage par synthèse (contrairement à la méthode de Sanger)(Hyman 1988). Cette technique fut par la suite remaniée et améliorée par une autre équipe de recherche en introduisant dans la technique une étape de PCR (Ronaghi et al. 1996; Ronaghi et al. 1998a; Ronaghi et al. 1998b). Il s'agit donc d'un séquençage par synthèse (« sequencing by synthesis », SBS) se caractérisant par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (« real time sequencing ») qui ajoute un seul nucléotide. Le pyroséquençage est composé de 5 étapes (Figure 9). Lors de la première étape, un mélange réactionnel est préparé composé des enzymes clefs et des différents substrats (nucléotides, ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase et apyrase, Adénosine 5' phosphosulfate (APS) et luciférine).

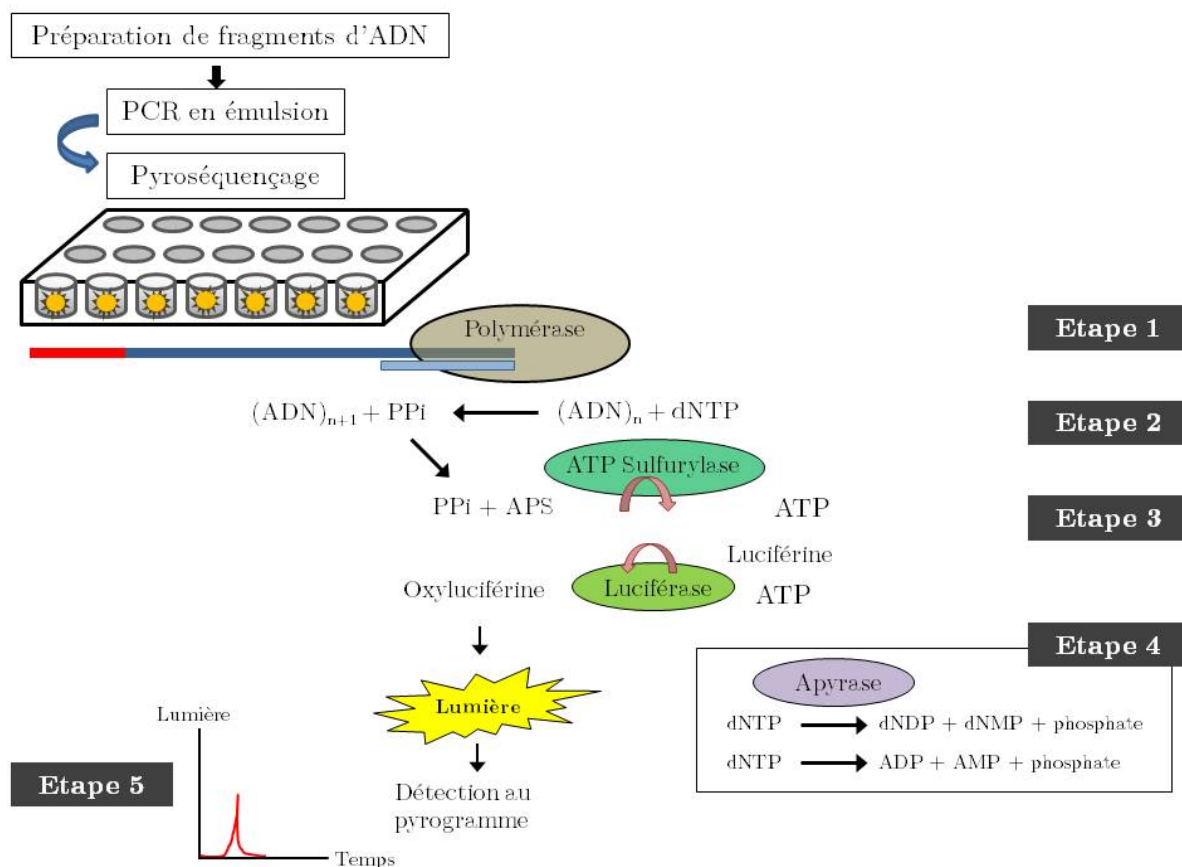


Figure 9 : Schéma général du principe de pyroséquençage.

Etape 1 : Préparation du mélange réactionnel (enzymes clefs et des différents substrats)

Etape 2 : Ajout des nucléotides (les uns après les autres), incorporation dans le brin néosynthétisé et libération d'un pyrophosphate.

Etape 3 : Production d'oxyluciférine via la luciférase et libération d'un signal lumineux.

Etape 4 : Dégradation des nucléotides restants par l'apyrase.

Etape 5 : Forme d'un pic sur le pyrogramme à partir du signal lumineux précédemment formé. La séquence est déduite à partir de la hauteur du pic.

Lors de la deuxième étape, les nucléotides sont ajoutés les uns après les autres (contrairement à une réaction de séquençage normale). Si le nucléotide ajouté correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élongation) et un Pyrophosphate (PPi) est libéré. Dans un troisième temps, l'ATP sulfurylase vient transformer le PPi néoformé en ATP qui est alors utilisé, couplé à une Luciférine, par une Luciférase. On a alors production d'Oxyluciférine et d'un signal lumineux (étape 3). Lors d'une quatrième étape, l'Apyrase dégrade les nucléotides non utilisés (en surplus). Enfin, lors de la dernière étape (étape 5), le signal lumineux produit est capté et reproduit sous forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux. De plus, cette intensité est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. La séquence est déduite à partir de la hauteur du pic. La technique de pyroséquençage ainsi décrite entre dans divers protocoles tels que le pyroséquençage 454 avec des étapes rajoutées (PCR par émulsion) selon les méthodes utilisées. La technique de pyroséquençage permet, de manière générale, l'obtention rapide de séquences et ce à moindre coût. Ces séquences étaient au début assez courtes mais, de nos jours, les nouvelles techniques permettent l'obtention de séquences assez longues (jusqu'à 1000pb). Différentes applications du pyroséquençage existent comme le génotypage des SNP, le typage microbien (revu dans (Ronaghi 2001) et (Langaee and Ronaghi 2005)) ou même le séquençage de génomes (Margulies et al. 2005). L'isolement et le développement de marqueurs microsatellites sont des applications possibles.

En 2009, deux études ont été les premières à utiliser le direct shotgun pyrosequencing pour isoler et développer des marqueurs microsatellites spécifiques (Abdelkrim et al. 2009; Allentoft et al. 2009), respectivement sur l'Hyménolaime bleu

(*Hymenolaimus malacorhynchos*) (oiseau) et sur *Pachyornis elephantopus* (oiseau terrestre éteint). Elles ont pu montrer qu'à partir de cette technique, on pouvait facilement obtenir des microsatellites en réduisant le coût et le temps que nécessitaient habituellement les autres techniques. Le principe général reste simple et est basé sur le fait que les marqueurs microsatellites en général sont en quantité assez suffisante dans le génome pour que lors de « runs » de pyroséquençage, une grande quantité de « reads » (séquences) obtenus en contiennent. Pour cette technique, tout d'abord, on extrait de l'ADN génomique en quantité et qualité suffisante et on applique sur cet ADN les méthodes de pyroséquençage. Ainsi, à partir d'1/2 « run » voire beaucoup moins, on obtient une quantité importante de « reads » plus ou moins longs. L'enjeu ensuite est bioinformatique. En effet, à l'aide de logiciels spécialisés, on détecte les séquences contenant des motifs microsatellites. Puis après plusieurs étapes de tri, les séquences d'intérêt sont gardées et des premiers tests d'amplification *in silico* sont effectués avec des amorces développées pour l'occasion. Enfin, les tests en conditions réelles (PCR *in vivo*) sont menés pour confirmer la possibilité d'amplification ainsi que le potentiel à être polymorphe des marqueurs.

Après ces deux premières études, plusieurs autres ont suivi sur toutes sortes d'organismes : plantes (*Comarum palustre* (la potentille des marais), *Vigna radiata* (le haricot mungo...), animaux (*Tachyglossus aculeatus* (l'échidné à nez court), *Elseya albagula* (tortue)...) et même champignons (*Peltigera dolichorhiza* (lichen)) (Tableau 3). Toutes ont confirmé la possibilité d'obtention de marqueurs microsatellites polymorphes et l'efficacité tant en coût qu'en temps de cette technique.

Tableau 3 : Caractéristiques des études ayant développé des marqueurs SSR à partir de direct shotgun pyrosequencing.

Le nombre d'individus et la taille d'échantillonnage de chaque étude sont indiqués en colonnes 3 et 4. Le nombre de paires de bases, la taille moyenne de séquence et le nombre de séquences obtenus sont indiqués pour chaque étude en colonne 5,6 et 7 respectivement.

Etude	Organisme	Nombre d'individus séquencés	Echantillon séquencé	Mpb	Longueur moyenne d'un read (bp)	Nombre de reads obtenus et screenés
Molinier et al. 2013	<i>Tuber aestivum</i> (Pezizales, Tuberaceae ; <i>Fungi</i>)	1	1/2 plaque	195	561	411374
(Somme et al. 2012)	<i>Comarum palustre</i> (Rosales, Rosaceae ; <i>Plantae</i>)	1	1/8 plaque	24	191	63860
(Buehler et al. 2011)	<i>Arabis alpina</i> (Capparales, Brassicaceae ; <i>Plantae</i>)	1	1/16 plaque	14	354	40367
(Carvalho and Beheregaray 2011)	<i>Conorhynchus conirostris</i> (Siluriformes, Pimelodidae ; <i>Animalia</i>)	1	1/16 plaque	NG	NG	35724
(Green et al. 2011)	<i>Paratya australiensis</i> (Decapoda, Atyidae ; <i>Animalia</i>)	4	1/8 plaque	54>X>18	450>X>150	121252
(Lepais and Bacles 2011)	<i>Acacia harpophylla</i> (Fabales, Mimosaceae ; <i>Plantae</i>)	1	NG	93.8	394	172820
(Metzger et al. 2011)	<i>Vipera ursinii</i> (Squamata, Viperidae ; <i>Animalia</i>)	1	1/16 plaque	NG	316.2	37227
(Perry and Rowe 2011)	<i>Gerris incognitus</i> (Hemiptera, Gerridae ; <i>Animalia</i>)	5	1/4 plaque	61.5	369	182912
(Todd et al. 2011)	<i>Elseya albagula</i> & <i>Emydura macquarii</i> (Testudines, Chelidae ; <i>Animalia</i>)	6 pour chaque	1/2 plaque	36.6 /46.2	340	108200 /135200
(Vargas et al. 2011)	<i>Chenopodium pallidicaule</i> (Caryophyllales, Chenopodiaceae, <i>Plantae</i>)	1	NG	29	NG	116912
(Abbott et al. 2010)	<i>Didemnum verillum</i> (Aplousobranchia, Didemnidae ; <i>Animalia</i>)	Plusieurs	1+1/8 plaques	400	300	1300000
(Boomer and Stow 2010)	<i>Mustelus antarcticus</i> (Carcharhiniformes, Triakidae ; <i>Animalia</i>)	1	1/8 plaque	NG	NG	NG
(Castoe et al. 2010)	<i>Agkistrodon contortrix</i> (Squamata Viperidae ; <i>Animalia</i>)	1	3/8 plaque	27	215	128773
(Clarke et al. 2010)	<i>Baumea juncea</i> (Poales, Cyperaceae ; <i>Plantae</i>)	1	NG	NG	NG	NG
(Clay et al. 2010)	<i>Leiopelma hochstetteri</i> (Anoura, Leiopelmatidae ; <i>Animalia</i>)	1	1/8 plaque	NG	NG	41956
(Csencsics et al. 2010)	<i>Typha minima</i> (Typhales, Typhaceae ; <i>Plantae</i>)	1	1/16 plaque	26.1	341.3	76692
(Hale et al. 2010)	<i>Hemideina ricta</i> (Orthoptera, Anostostomatidae ; <i>Animalia</i>)	1	1/16 plaque	NG	NG	18333
(Magain et al. 2010)	<i>Peltigera dolichorrhiza</i> (lichen) (, Peltigerales ; <i>Peltigeraceae</i> ; <i>Fungi</i>)	NG	NG	185	NG	467027
(Saarinen and Austin 2010)	<i>Etheostoma okaloosae</i> (Perciformes, Percidae ; <i>Animalia</i>)	NG	1/8 plaque	29	352	82463
(Sexton et al. 2010)	<i>Khaya senegalensis</i> (Sapiendales, Meliaceae ; <i>Plantae</i>)	Plusieurs	NG	33.7	346.6	97351
(Abdelkrim et al. 2009)	<i>Hymenolaimus malacorrhynchus</i> (Anseriformes Anatidae ; <i>Animalia</i>)	Plusieurs	1/16 plaque	4.1	243	17215
(Allentoft et al. 2009)	<i>Pachyornis elephantopus</i> (Struthioniformes, Dinornithidae ; <i>Animalia</i>)	1	1/4 plaque	NG	112	79796
(Lee et al. 2009)	<i>Amaranthus tuberculatus</i> (Caryophyllales, Amaranthaceae ; <i>Plantae</i>)	1	1/2 plaque	42.8	271	158015
(Rasmussen and Noor 2009)	<i>Megaselia scalaris</i> (Diptera, Phoridae ; <i>Animalia</i>)	Plusieurs	1/4 plaque	29.7	231	129080
(Tangphatsornruang et al. 2009)	<i>Vigna radiata</i> (Fabales, Fabaceae ; <i>Plantae</i>)	1	NG	100.5	216	470024
(Vanpe et al. 2009)	<i>Tachyglossus aculeatus</i> (Monotremata, Tachyglossidae, <i>Animalia</i>)	NG	12 runs	NG	NG	885433

IV. Conclusion de la première partie

Dans cette première partie, nous avons dressé un état de l'art sur les différents concepts et outils utilisés en biologie évolutive. Cette partie, certes théorique, est importante car elle permet de situer notre travail dans un contexte global. Elle permet de mieux comprendre les questions qui ont été posées et aussi rappeler les bases de la biologie évolutive. Comme évoqué précédemment, la notion d'espèce est un concept central et beaucoup de disciplines biologiques telles que la phylogénie et indirectement la génétique des populations et la phylogéographie y sont reliées. Différents marqueurs moléculaires sont utilisés dans ce type d'analyses. Les microsatellites restent à ce jour les marqueurs de choix pour étudier la structuration des populations et l'histoire évolutive d'une espèce. Du fait de l'avancée des techniques, il est de plus en plus facile de développer *de novo* des marqueurs microsatellites pour une espèce donnée.

Dans la deuxième partie de cette introduction, nous allons nous intéresser plus particulièrement au modèle biologique étudié durant cette thèse, la truffe de Bourgogne. Ce modèle sera tout d'abord replacé dans le contexte général de la symbiose ectomycorhizienne. Puis, dans un deuxième temps, la truffe de Bourgogne sera plus précisément présentée ainsi que ses caractéristiques propres qui ont joué un rôle dans la définition des objectifs de ce travail de recherche.

Partie II : Modèle d'étude : Qu'est ce que la Truffe ?

"Diamant de la Cuisine"

(Brillat-Savarin)

"Pomme féérique"

(George Sand)

"Gemme des Terres pauvres"

(Colette)

"Perle noire"

(Fulbert Dumonteil)



I. Champignons et symbioses ectomycorhiziennes

A. Les champignons au sens large

Le phylum des champignons s'est séparé du règne animal aux alentours de -1 milliard d'année (+/- 500 millions) (Berbee and Taylor 2010). On dénombre à ce jour à peu près 99000 espèces de champignons (Kirk et al. 2008). Cependant les estimations sont de très loin plus importantes ; en effet, on estime le nombre d'espèces de champignons existantes à plus de 5 millions (Blackwell 2011). Le phylum des champignons regroupe des organismes très hétérogènes tant sur un plan morphologique que biologique. Néanmoins, ils partagent certaines propriétés et caractéristiques. En effet, en premier lieu, ils sont tous eucaryotes. Ensuite, ils ne peuvent pas synthétiser par leur propres moyens le carbone, ils sont donc hétérotrophes pour cet élément. Ils se nourrissent par absorption et non par ingestion. Cette absorption est possible grâce à leur appareil végétatif, le mycélium, qui est en général diffus, ramifié et constitué d'hyphes qui sont des filaments fins. Comme pour le règne animal, ils sont opisthochontes, c'est-à-dire dérivant d'espèces ayant une phase aquatique avec des gamètes à un seul flagelle propulseur. Cette caractéristique est encore visible chez certains taxons comme les chytridiomycètes, cependant la majorité des champignons a perdu cette phase aquatique obligatoire et possède des spores sans flagelle. Leur paroi contient des β -1,3 glucanes, de l'hémicellulose et de la chitine. Non différenciés sexuellement, ils produisent des spores haploïdes en grande quantité après une dicaryophase qui peut s'avérer être plus ou moins longue entre la plasmogamie et la caryogamie.

D'un point de vue phylogénétique, et selon les dernières études, les champignons regroupent sept grands phyla (Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota et Microsporidia), un sous-règne (Dikarya) incluant les Ascomycota et les Basidiomycota, 35 classes et 129 ordres (Hibbett et al. 2007). Cependant, dans cette phylogénie certains taxons ont des places incertaines (*incertae sedis*) (Figure 10). De plus, un des grands changements dans cette phylogénie, par rapport aux précédentes, est l'éclatement du phylum Zygomycota qui n'y figure plus car non phylogénétiquement justifié. Les taxons préalablement assignés aux Zygomycota sont maintenant dispersés au sein du phylum des Glomeromycota et dans 4 sous-phyla *incertae sedis* (Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina et Entomophthoromycotina). Les autres changements importants sont d'une part l'apparition en tant que phylum à part entière des Blastocladiomycota comprenant l'ordre des Blastocladales qui, traditionnellement étaient inclus dans le phylum des Chytridiomycota. D'autre part, le phylum des Neocallimastigomycota apparaît, lui aussi, comme un phylum à part entière quittant le phylum des Chytridiomycota.

On peut classer les différents organismes fongiques selon leurs préférences nutritionnelles et ceci sans valeur phylogénétique :

Les champignons saprophytes qui se développent et se nourrissent sur des organismes morts en décomposition

Les champignons pathogènes qui se développent et se nourrissent au dépens d'un autre organisme

Les champignons symbiotiques mutualistes qui mettent en place une association durable avec un autre organisme. Ils développent des structures spécifiques qui facilitent les échanges à bénéfices réciproques.

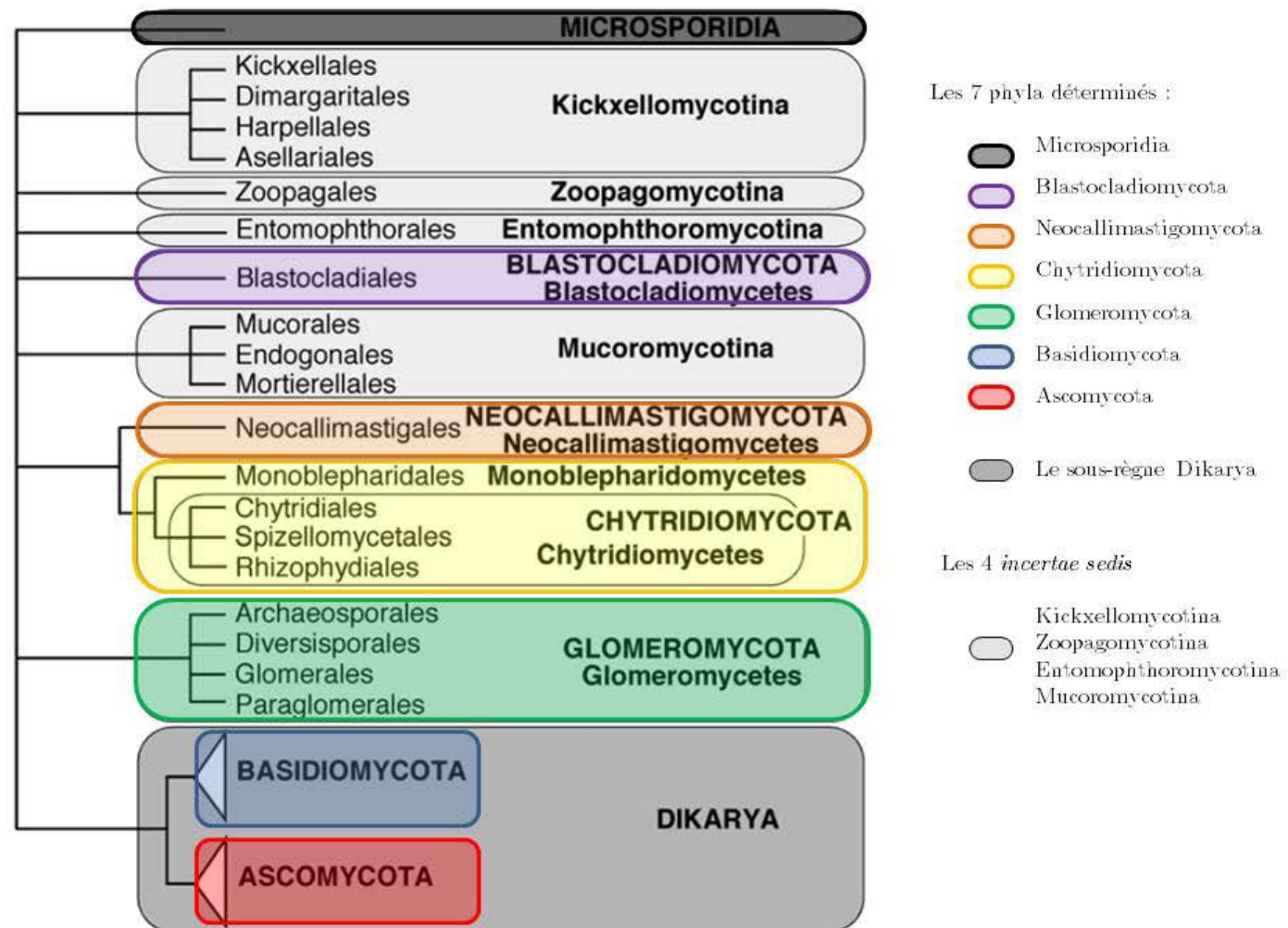


Figure 10 : Phylogénie et classification des champignons

Adapté de Hibbett 2007. (La longueur des branches n'est pas proportionnelle aux distances génétiques)

B. La symbiose mycorhizienne

1. Quelques généralités

La symbiose mycorhizienne (du grec *mykós*, « champignon » et *rhiza*, « racine ») est une association à bénéfices mutuels entre un champignon et les racines d'une plante. Cette symbiose est l'une des plus importantes et répandues au sein de l'écosystème terrestre (Smith and Read 2008). En effet, la symbiose mycorhizienne concerne 95% des plantes terrestres (herbacées ou ligneuses) et se retrouve dans quasiment tous les types de milieux.

Les hyphes fongiques, qui sont spécialisés dans l'absorption de minéraux du sol, permettent à la plante d'augmenter sa capacité d'absorption de nutriments essentiels tels que le soufre, le phosphore, l'azote et l'eau en agissant comme une extension du système racinaire (Smith and Read 2008). De plus, le partenaire fongique a un rôle de protection pour la plante hôte envers des stress abiotiques (sécheresse, accumulation de métaux lourds) et des stress biotiques (pathogènes) (Smith and Read 2008). Le champignon quant à lui, hétérotrophe, trouve son besoin en sucre chez la plante en puisant les composés carbonés dérivés de la photosynthèse. Les structures générées par l'association mycorhizienne peuvent être classées sur la base de critères écologiques, morphologiques et physiologiques ainsi que par rapport à la position phylogénétique des deux partenaires. On distingue donc plusieurs types de mycorhizes : les mycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes, ainsi que les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes, éricoïdes et orchidoïdes (Smith and Read 2008). Chacune de ces symbioses possède ses propres caractéristiques sur un plan morphologique (cloisonnement du champignon, colonisation intracellulaire...) et sur la nature des partenaires fongiques et végétaux (Tableau 4).

Tableau 4: Caractéristiques principales des différents types de mycorhizes.

D'après Smith et Read, 2008.

Type de mycorhize	Mycorhize à arbuscules	Ectomycorhize	Ectendomycorhize	Mycorhize arbutoïde	Mycorhize monotropoïde	Mycorhize ericoïde	Mycorhize orchidée
Champignons cloisonnés	-	+	+	+	+	+	+
Colonisation intracellulaire	+	-	+	+	+	+	+
Manchon fongique	-	+	+ ou -	+ ou -	+	-	-
Réseau de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Partenaire fongique	Glomeromycètes	Basidiomycètes Ascomycètes	Basidiomycètes Ascomycètes	Basidiomycètes	Basidiomycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes
Partenaire végétal	Bryophytes Ptéridophytes Gymnospermes Angiospermes	Gymnospermes Angiospermes	Gymnospermes Angiospermes	Ericales	Ericales	Ericales Bryophytes	Orchidales

Les deux symbioses mycorhiziennes les plus communes et répandues sont la symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA) et la symbiose ectomycorhizienne (ECM). La symbiose MA concerne 80% des plantes terrestres ; la majorité étant des herbacées (Smith and Read 2008). Cette symbiose est donc ubiquitaire. Elle serait apparue il y a environ 450 millions d'années quand la flore terrestre était principalement constituée de plantes semblables aux Bryophytes (« mousses ») (Redecker et al. 2000). Ces champignons auraient donc joué un rôle dans la colonisation du milieu terrestre par les plantes et cela expliquerait qu'à l'heure actuelle cette symbiose soit généraliste. Alors que 80% des plantes terrestres sont concernées, côté champignon, seul un phylum fongique est impliqué dans cette symbiose ; les Glomeromycota. Ce phylum monophylétique est un groupe frère des

Ascomycota et Basidiomycota (Figure 10) (Schüßler et al. 2001) et comporte seulement approximativement 230 espèces à ce jour (Schüßler and Walker 2010). Les champignons impliqués dans la symbiose MA sont des biotrophes obligatoires des racines des plantes. Ils colonisent donc les racines des plantes pour achever leur cycle biologique (Figure 11). Dans le sol, les champignons mycorhiziens à arbuscules sont à l'état de spores. Ces spores germent et des hyphes se forment. Avant de s'introduire dans la cellule, le champignon forme une structure spécialisée appelée « appareil de prépénétration » qui permet de guider et d'orienter le chemin du champignon et donc sa croissance dans l'espace cellulaire. Au contact de la racine, le champignon pénètre après avoir formé un hyphopodium (ou appressorium) grâce auquel le champignon peut coloniser la racine jusqu'au cortex. C'est à ce moment là que le champignon pénètre véritablement dans la cellule. Il forme ensuite des structures spécialisées ramifiées et dichotomiques appelées « arbuscules » qui permettent le transfert de nutriments entre les deux partenaires. En effet, la membrane plasmique de la cellule hôte suit les sinuosités des branches arbusculaires et donc la surface d'échange est augmentée. On parle de membrane péri-arbusculaire. En parallèle, le champignon développe de nouveaux hyphes (mycélium extraradicalaire) qui croissent de la racine vers le sol et qui permettent l'absorption des nutriments et leur transport. De nouvelles spores peuvent se former au niveau de ces hyphes, pouvant mener à de nouveaux épisodes de colonisation.

La deuxième symbiose la plus commune est la symbiose ectomycorhizienne. Dans la prochaine partie, nous allons voir en détail ses caractéristiques et propriétés.

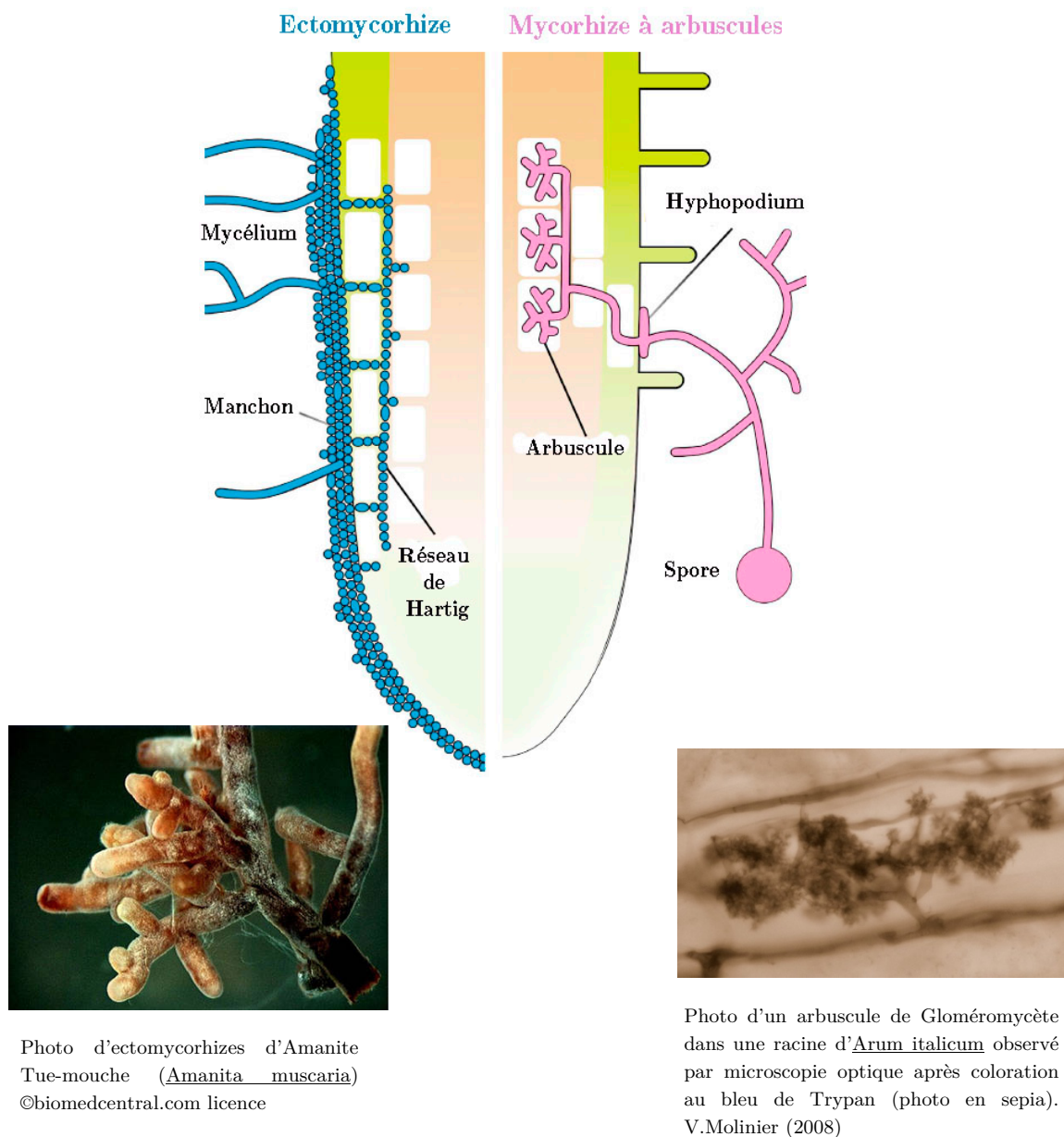


Figure 11 : Comparaison structurale entre la mycorhize à arbuscules et l'ectomycorhize

(adapté de Bonfante et Genre, 2010) (Bonfante and Genre 2010)

2. *La symbiose ectomycorhizienne*

En 1885, Frank décrivit pour la première fois les ectomycorhizes en observant des racines d'arbres forestiers de la zone tempérée. C'est lui qui, le premier, les interpréta en termes de symbioses (Frank 1885) ; texte traduit en anglais en 2005 par Trappe (Trappe 2005). Cette symbiose, contrairement à la symbiose mycorhizienne à arbuscules, est plus récente. Elle daterait au moins du tertiaire, le plus vieux fossile trouvé à ce jour datant de 50 millions d'années (LePage et al. 1997). Cependant, des études montrent que la famille des *Pinaceae* serait certainement la plus vieille famille à former des ectomycorhizes (Hibbett and Matheny 2009). Le plus vieux fossile de la famille des *Pinaceae* datant de 156 millions d'années ((LePage 2003) cité dans (Tedersoo et al. 2010)), on peut supposer que la symbiose est plus ancienne que le fossile retrouvé datant de 50 millions d'années. Cela serait expliqué par le fait que les champignons sont faits de structures très molles difficilement conservables au cours du temps et donc peu fossilisables. D'autres études montrent que certains taxa du phylum des Agaricomycètes et du clade des Pezizales auraient subi des radiations entre 150 et 200 millions d'années (Berbee and Taylor 2001). Cela conforterait l'antériorité de la symbiose ectomycorhizienne. Au cours du temps, cette symbiose a évolué à plusieurs reprises et durant des évènements indépendants (Tedersoo et al. 2010). De ce fait, d'un point de vue phylogénétique, les différents partenaires (champignons et plantes) appartiennent à différents phyla.

a) Les deux partenaires impliqués

Côté plantes, 6000 espèces sont concernées par la symbiose ectomycorhizienne (Brundrett 2009) ce qui représente seulement 3% des végétaux dits vasculaires (Smith and Read 2008). Cependant, cette symbiose concerne de très

nombreuses espèces ligneuses. Parmi les plus communes dans les régions tempérées, se trouvent les espèces de la famille des *Pinaceae* (sapin, cèdre, pin...), *Betulaceae* (bouleau, noisetier...) et des *Fagaceae* (châtaigner, chêne...). Pour les régions tropicales, ce sont principalement des espèces ligneuses appartenant aux familles des *Myrtaceae* et *Dipterocarpaceae*. La symbiose ectomycorhizienne présente donc une répartition géographique très étendue et un spectre d'hôtes, certes restreint, mais diversifié.

Côté champignons, en terme de diversité taxonomique, sur les 99000 espèces répertoriées (Kirk et al. 2008) environ 20000 à 25000 espèces seraient ectomycorhiziennes, appartenant à des lignées ayant évolué indépendamment (Rinaldi et al. 2008; Tedersoo et al. 2010). Ces espèces fongiques font partie pour la grande majorité des phyla des Basidiomycota et des Ascomycota (respectivement 37 et 27 lignées). Cependant, on observe des champignons ectomycorhiziens dans d'autres phyla comme chez les Zygomycota phylum des Endogonales (Tedersoo et al. 2010). La plupart des champignons ectomycorhiziens forme des fructifications visibles notamment dans le phylum des Basidiomycota, telles les familles des *Amanitaceae*, *Russulaceae*, *Boletaceae* ou encore *Cantharellaceae*. Chez les Ascomycota, les espèces formant des ectomycorhizes sont nombreuses, les plus connues sont certainement les espèces de la famille des *Tuberaceae* et notamment du genre *Tuber* : les Truffes.

b) Généralités sur la structure d'une ectomycorhize

L'ectomycorhize est un organe avec une structure assez homogène bien que la diversité phylogénétique des partenaires impliqués dans cette association soit importante. En effet, on observe de manière générale tout d'abord des hyphes

(filaments de champignons), constituant le mycélium (appareil végétatif) qui colonisent les jeunes racines. Ces filaments pénètrent alors dans l'espace intercellulaire des premières assises cellulaires sans pénétrer l'endoderme. Un réseau est alors formé : le réseau de Hartig. Il est le siège des échanges bi-directionnels entre la plante et le champignon (Figure 11).

Les hyphes, à l'extérieur, se réunissent en agglomérats pour constituer le manteau qui peut être plus ou moins important. Les filaments mycéliens se détachent du manteau fongique et forment le réseau extra-matriciel dans le sol. Les racines « courtes » de la plante sont transformées et prennent des aspects différents selon les cas (couleurs, morphologies...) : les mycorhizes proprement dites (Tedersoo et al. 2006; Agerer 2002). En effet la couleur, l'épaisseur et l'aspect du manteau fongique peuvent différer entre organismes de familles et de genres différents mais aussi au sein d'une même famille ou d'un même genre (Figure 12).



Figure 12 : Observations d'ectomycorhizes de Pézizales

Parmi les champignons ectomycorhiziens, se trouve la famille des *Tuberaceae* et son genre le plus connu ; le genre *Tuber*. Nous allons voir dans la prochaine partie quelles sont les particularités de cette famille puis de ce genre plus spécifiquement.

II. Les Tubéracées et le genre *Tuber*

A. Description de la famille des *Tuberaceae* et de son apparition sur le plan évolutif

1. *La famille des Tuberaceae et les genres qu'elle regroupe*

Au sein du règne fongique, le phylum des Ascomycota est celui qui regroupe le plus d'espèces fongiques connues (64000) (Kirk et al. 2008). La synapomorphie définissant ce phylum est la présence d'une structure spécialisée s'apparentant à un sac (*ascus*) au sein duquel se forment les spores méiotiques (ascospores). D'un point de vue phylogénétique, on dénombre à ce jour deux sous-phyla monophylétiques, les Pezizomycotina et Saccharomycotina ainsi qu'un autre sous phylum appelé Taphrinomycotina (qui regroupe 4 lignées) mais dont la monophylie, bien qu'avancée, est encore discutée selon les études (Hibbett et al. 2007; James et al. 2006; Spatafora et al. 2006; Eriksson 2006) (Figure 13). Dans le sous phylum des Pezizomycotina, au moins 10 clades monophylétiques sont observés dont celui des Pezizomycètes. Au sein de ce clade, on dénombre différentes familles et organismes dont certains sont très connus comme le genre *Terfezia* (« truffes » du désert), le genre *Peziza* qui est saprophyte, le genre *Morchella* (morilles) ou encore la famille des *Tuberaceae* (truffes).

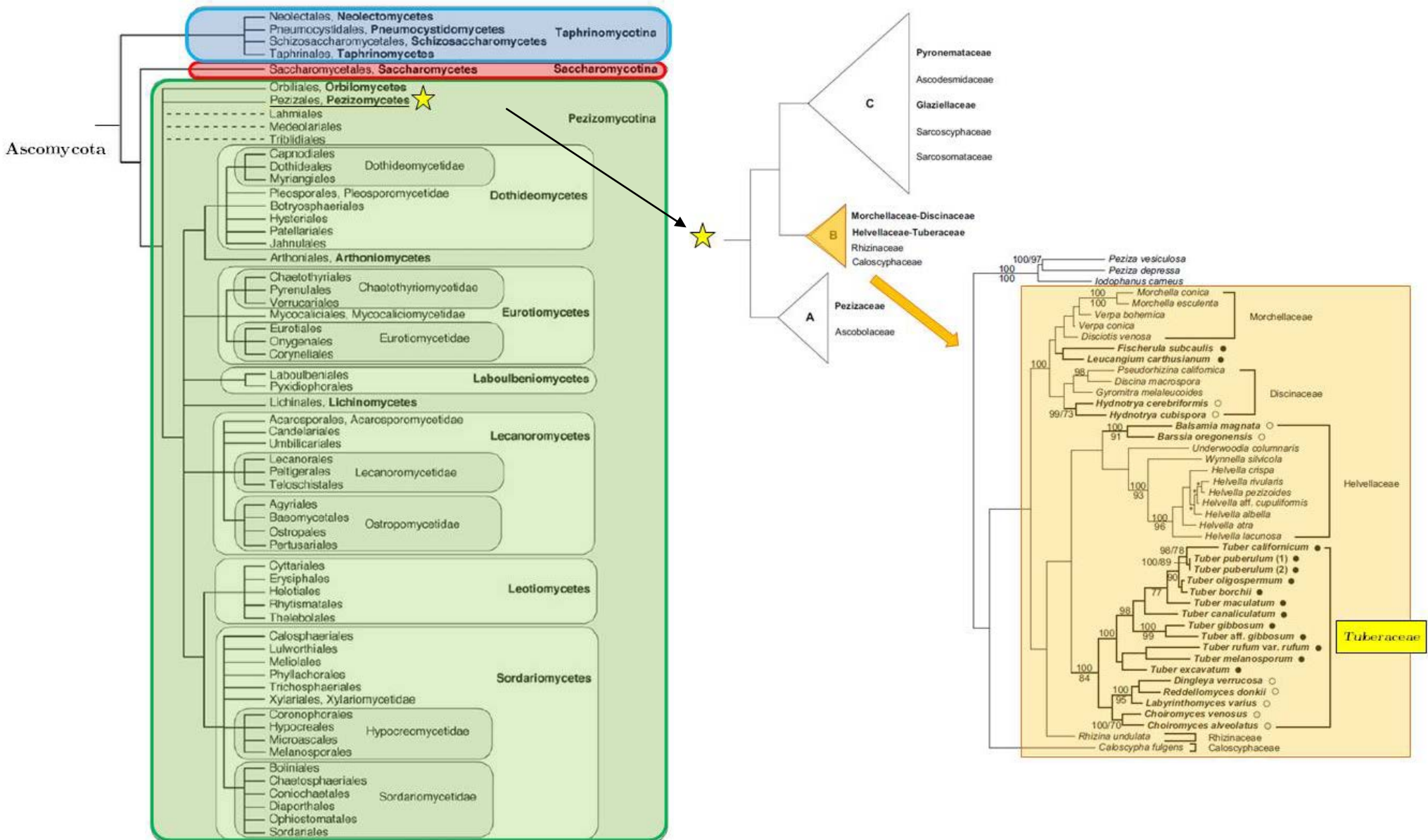


Figure 13 : Phylogénie et Classification des *Tuberaceae*

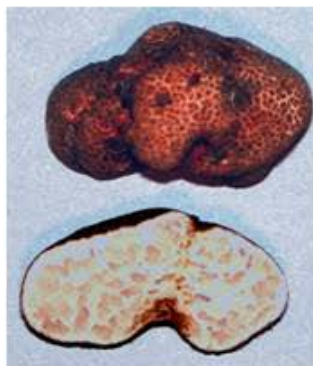
D'après (Hibbett et al. 2007) et (Laessle and Hansen 2007).

La famille des *Tuberaceae* décrite pour la première fois en 1822 par Du Mortier (Du Mortier 1822) regroupe actuellement sept genres *Choiromyces*, *Dingleya*, *Labyrinthomyces*, *Loculotuber*, *Paradoxa*, *Reddellomyces* et *Tuber* (Laessoe and Hansen 2007) (Figure 14). Le genre *Loculotuber* reste cependant encore *incertae sedis* de par le manque de données. Il pourrait ne pas être un genre à part entière mais être inclus dans le genre *Tuber* (Bonito et al. 2013). Les genres *Reddellomyces*, *Dingleya* et *Labyrinthomyces* sont originaires de l'hémisphère Sud (Laessoe and Hansen 2007).

Comme on peut le voir sur la Figure 14, les différentes espèces de la famille des *Tuberaceae* présentent, morphologiquement, de grandes similarités. Leurs corps fructifères (ascocarpes) sont hypogés c'est-à-dire qu'ils sont trouvés exclusivement dans le sol. Cette structure s'est spécialisée, tout au long de l'évolution, de façon à optimiser la dispersion des spores par les animaux et notamment par les mammifères. Une étude très récente remet en cause la généralité du caractère hypogé des champignons au sein de la famille des *Tuberaceae* (Bonito et al. 2013). En effet l'espèce *Nothojafnea thaxteri* qui est un champignon à fructification épigée appartiendrait à la famille des *Tuberaceae*.



Choiromyces venosum
© Etienne Charles
<http://champignons.moselle.free.fr>



Dingleya geometrica
© James Trappe



Labyrinthomyces sp.
© James M. Trappe
<http://tartufi-online.com/>



Loculotuber gennadii
<http://www.socmicolmadrid.org>



Paradoxa sinensis
Fan et al. 2012



Reddellomyces donkii
© Enrique Rubio Domínguez
<http://www.asturnatura.com>



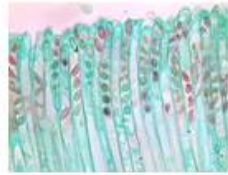
Tuber magnatum
© Antonio Rodríguez 2006
<http://www.mycodb.fr>

Figure 14 : Photos de spécimens des 7 genres de la famille des *Tuberaceae*.

2. *Apparition des Tuberaceae et évolution pezize vers truffe*

La famille des *Tuberaceae* est certainement l'un des clades qui a divergé le plus tôt au sein des *Pezizomycotina* (Padovan et al. 2005). L'origine des *Tuberaceae* remonterait à -156 millions d'années (Bonito et al. 2013) et serait donc concomitante avec le début de la radiation des Eudicotylédones.

Comme nous l'avons vu précédemment, la famille des *Tuberaceae* regroupe en très grande majorité des champignons à fructifications hypogées en forme de « truffes » (ici le terme truffe est purement descriptif et non associé à une quelconque classification ou à l'appartenance au taxons des « truffes »). Il a été avancé que d'un point de vue évolutif, les organismes hypogés de la famille des *Tuberaceae* auraient évolué au niveau de la morphologie de l'ascospore. En effet, différentes études expliquent que ces champignons auraient eu un ancêtre de forme pezizoïde (d'apparence similaire au genre *Peziza*) qui aurait évolué au cours du temps en donnant l'aspect truffe aux individus de cette famille (Figure 15). L'hypothèse avancée serait que des formes intermédiaires, telles que des formes rappelant certaines espèces de *Genea* ou *Geospora* aient existé. Cela serait dû à une adaptation pour réduire les pertes en eau et augmenter le pouvoir de dissémination par les petits animaux (Percudani et al. 1999). Les champignons épigés produisent des ascocarpes ouverts en formes de coupe dans lesquels se trouvent les asques renfermant les ascospores qui sont disséminées par la voie aérienne (Trail 2007). Au contraire, les champignons hypogés eux ont des ascospores renfermées (comme au sein des *Tuber*) et possèdent des veines stériles. Apparemment, la perte de la faculté de relargage des spores par voie aérienne est corrélée au passage « épigé » à « hypogé » (Laessle and Hansen 2007).



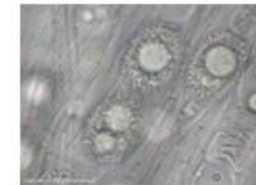
Asques de *Peziza*
<http://www.lima.ohio-state.edu>



Peziza
<http://www.mycodb.fr>
 ©Guy Fourré

Ancêtre Pezizoïde

**Ancêtre à forme
Genea**



Spores de *Genea*
<http://www.mycodb.fr>
 ©Michel Hairaud

Genea
<http://www.natruffling.org>
 ©James M Trappe



Asques
de *Geopora*
<http://fungi.myspecies.info>



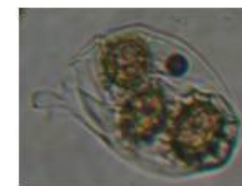
Geopora
<http://www.mykoweb.com>
 ©Michael Wood

**Ancêtre à forme
Geopora**

Forme Tuber



Tuber
 ©Virginie Molinier



Asque
de *Tuber*
 ©Virginie Molinier

Figure 15 : Evolution supposée de la morphologie du corps fructifère des *Tuberaceae*.

3. *Le genre Tuber*

En 1780, F.H. Wiggers fournit la première description valide du genre *Tuber* selon l'actuel code international de la nomenclature pour les algues, champignons et plantes : l'ICN (nouveau nom depuis janvier 2012 remplaçant le code international de la nomenclature botanique ICBN) (Karthick and Williams 2012)). C'est Vittadini à partir de 1831, qui donna des descriptions bien plus précises et avancées des espèces du genre *Tuber* (Vittadini 1831). Ce dernier regroupe exclusivement des champignons dits « hypogés » qui forment des carpophores sous terrains et qui établissent des ectomycorhizes. Une étude cependant a démontré que les espèces *Tuber* sont capables de former d'autres types de mycorhizes (autres qu'ectomycorhizes) : des endomycorhizes avec les orchidées (Selosse et al. 2004). Les « vraies truffes » appartiennent exclusivement à ce genre. Le genre *Tuber* aurait divergé au début du Crétacé aux environs de -142 millions d'années (Bonito et al. 2013; Jeandroz et al. 2008) (Figure 16). Par la suite, les différentes lignées se sont diversifiées comme par exemple la lignée */aestivum* entre -101 millions d'années et - 70 millions d'années (Bonito et al. 2013; Jeandroz et al. 2008). Au sein du genre *Tuber*, on dénombre actuellement plus de 225 espèces selon *l'Index Fungorum* mais il se pourrait que de mauvaises attributions existent (Jeandroz et al. 2008). En effet, une étude récente ne dénombre que 180 espèces de par l'existence pour une espèce donnée de plusieurs noms (Bonito et al. 2010b). En Europe, à ce jour, 34 espèces existent (Encadré 4). On peut notamment citer des espèces bien connues des gastronomes comme la truffe du Périgord (*Tuber melanosporum*), la truffe blanche (*Tuber magnatum*) mais aussi d'autres espèces communes comme la truffe mésentérique (*Tuber mesentericum*).

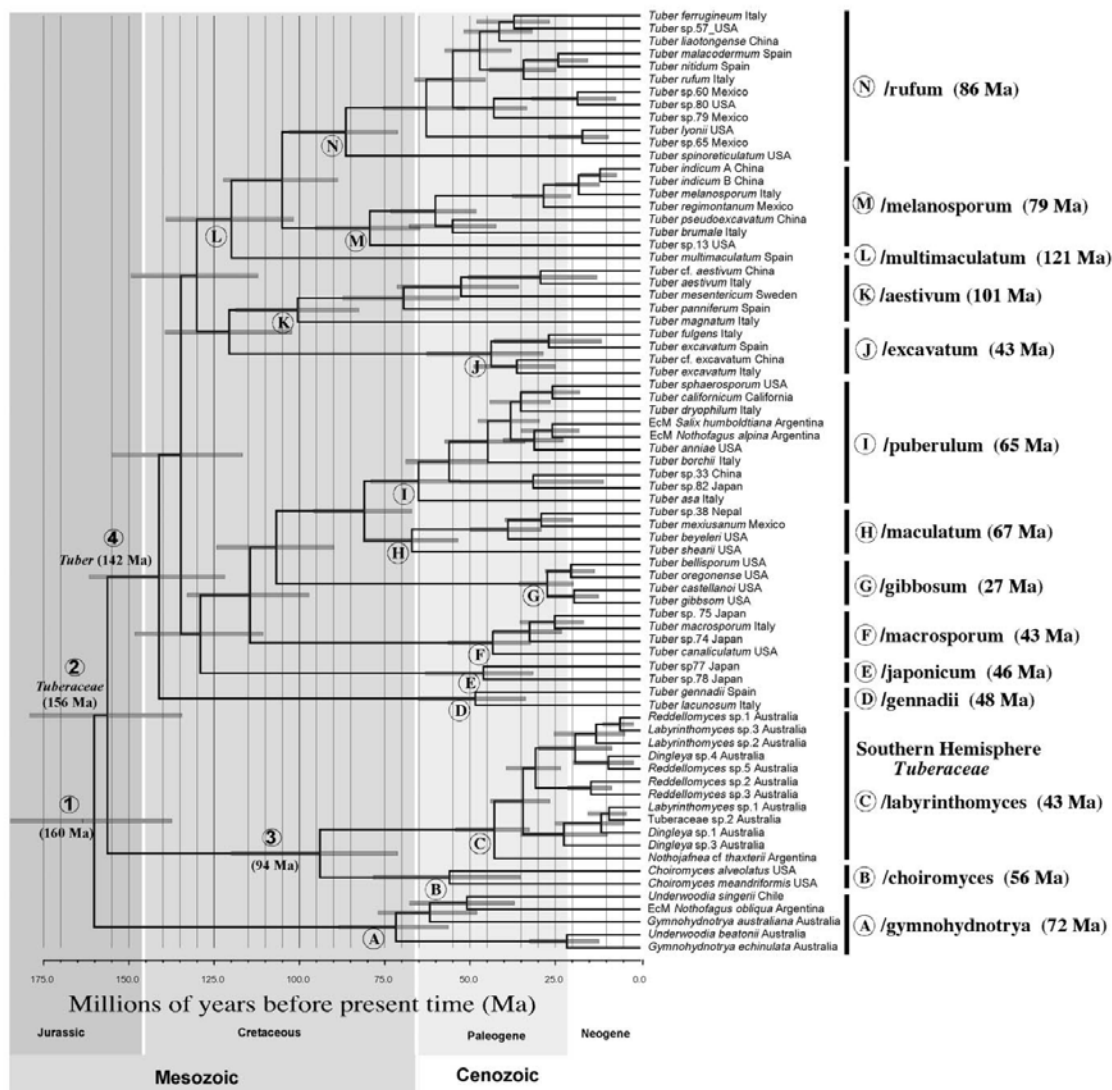


Figure 16 : Estimation des temps de divergence des taxons de la famille des *Tuberaceae*.

D'après (Bonito et al. 2013)

Tuber aestivum Vittadini
Tuber asa Tulasne & Tulasne
Tuber belionae Quelet
Tuber borchii Vittadini
Tuber brumale Vittadini
Tuber dryophilum Tulasne & Tulasne
Tuber excavatum Vittadini
Tuber ferrugineum Vittadini
Tuber foetidum Vittadini
Tuber fulgens Quelet
Tuber lutescens Lazaro & Ibiza
Tuber macrosporum Vittadini
Tuber maculatum Vittadini
Tuber magnatum Pico
Tuber malenconi Donadini, Rioussset, Rioussset, Chevalier
Tuber melanosporum Vittadini
Tuber mesentericum Vittadini
Tuber microsporum Vittadini
Tuber michailowskoanum Bucholtz
Tuber murinum Hesse
Tuber multimaculatum Parlade, Trappe & Alvarez
Tuber nitidum Vittadini
Tuber oligospermum Tulasne, Tulasne & Trappe
Tuber pallidum lazaro & Ibiza
Tuber panniferum Tulasne & Tulasne
Tuber puberulum Berkeley & Broome
Tuber queietianum Ferry de la Bellone
Tuber rapoeodorum Tulasne & Tulasne
Tuber regianum Montecchi & Lazzari
Tuber rufum Pico
Tuber scruposum Hesse
Tuber sinosum Lazaro & Ibiza
Tuber uncinatum Chatin
Tuber verii Pacioni & Lalli

Encadré 4 : Les 34 espèces de truffes européennes

B. Propriétés du genre *Tuber* et différenciation des espèces *Tuber*

Le genre *Tuber* regroupe des champignons qui présentent des similitudes dans certaines de leurs propriétés, comme par exemple leur cycle de vie, mais qui ont par contre des différences dans leurs propriétés morphologiques ou aromatiques.

1. *Les différentes phases de développement chez *Tuber**

Durant le cycle de vie des truffes, on dénombre trois phases importantes : la phase pré-symbiotique (phase saprotrophique), la phase symbiotique et la phase reproductive. Même si pour toutes les espèces du genre *Tuber* des différences ou variations peuvent exister, il semblerait que leur cycle suive celui de *Tuber melanosporum* (Martin et al. 2010). En s'appuyant sur ce dernier, regardons comment se déroule le développement d'une truffe en commençant par la phase saprotrophique (Figure 17). Cette phase commence par la germination des spores situées dans le sol. Il y a ensuite développement des hyphes jusqu'à rencontrer des racines de l'arbre hôte. Les facteurs rentrant en jeu durant cette phase sont : 1) la compétition entre espèces, 2) l'accès aux ressources essentielles au développement des hyphes, 3) les conditions physico-chimiques du milieu environnant (Buscot et al. 2000). S'en suit la phase symbiotique qui débute avec l'association des hyphes et des racines des arbres hôtes pour former les ectomycorhizes.

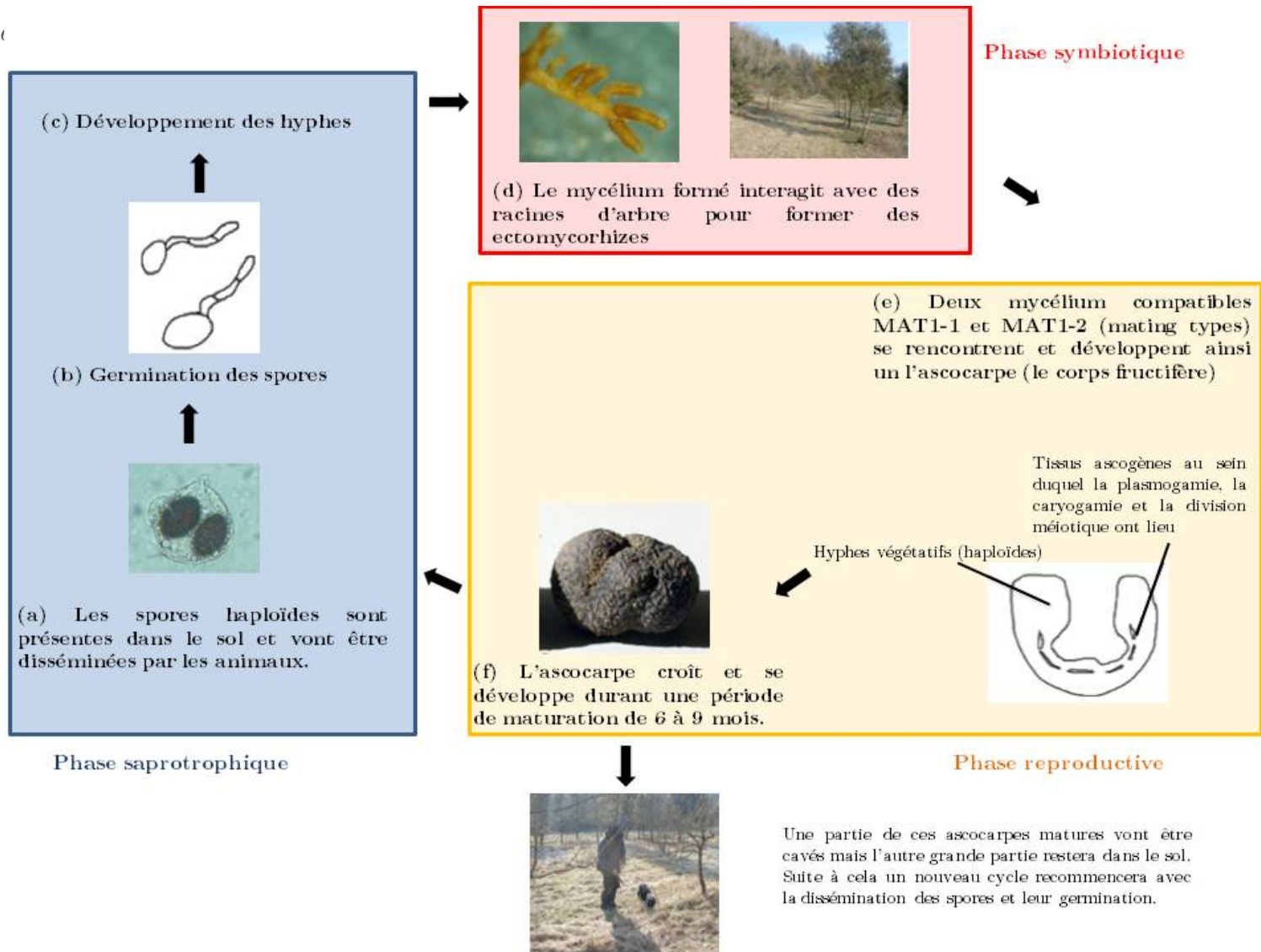


Figure 17 : Cycle de vie de *Tuber melanosporum*, la truffe noire du Périgord.

(Martin et al. 2010).

Comme vu dans le paragraphe des symbioses ectomycorhizienne, c'est lors de la phase symbiotique que le champignon forme un manteau fongique autour des cellules végétales. Ce manteau ne pénètre pas dans les cellules végétales et forme un réseau d'hyphes : le réseau de Hartig. C'est lors de cette association que le champignon peut puiser le sucre nécessaire à sa survie par l'intermédiaire du partenaire végétal doué de capacité photosynthétique. En revanche, la truffe fournit à la plante l'eau et les nutriments nécessaires à sa croissance. Cette association permet une meilleure protection pour la plante face aux pathogènes racinaires. Là aussi, plusieurs facteurs entrent en jeu durant cette phase : 1) conditions physico-chimiques du sol tels que le pH et l'humidité 2) nature de l'hôte mais aussi, 3) la compétition entre espèces fongiques. Durant la dernière phase de son cycle biologique, la phase reproductive, deux mycéliums compatibles se rencontrent. Le gène de compatibilité sexuelle a été mis en évidence suite au séquençage de *Tuber melanosporum* (Martin et al. 2010). Ce gène se décline sous deux idiomorphes MAT1-1 et MAT1-2 de structure différente. La caractérisation du sexe des individus est possible par l'emploi d'amorces spécifiques (Rubini et al. 2011a; Rubini et al. 2011b). Les deux mycéliums compatibles permettent ainsi le développement de l'ascocarpe. Ce corps fructifère va mettre plusieurs mois à croître et à murir. Une fois mature, il va disséminer les spores qu'il contient dans le sol et ainsi un nouveau cycle biologique recommencera. Cette dissémination se fait soit à l'endroit même où le corps fructifère se trouve soit par zoochorie. D'un point de vue de la génétique fonctionnelle, une étude récente basée sur des données transcriptionnelles a confirmé l'existence de l'induction spécifique de certains types de gènes dans une phase de développement donnée (Hacquard et al. 2013). En effet, il semblerait que durant la phase reproductive, dans l'ascocarpe par exemple, les gènes impliqués dans les processus d'oxido-réduction et dans le

métabolisme des composés sulfurés sont particulièrement actifs. Cela souligne l'importance du métabolisme soufré chez les truffes et notamment *Tuber melanosporum*. L'importante induction de ces types de gènes avait déjà été montrée auparavant (Martin et al. 2010) et confirme les résultats de Splivallo et collaborateurs sur la large gamme de composés sulfurés synthétisés par les truffes, rendant leur arôme unique (Splivallo et al. 2011). De même, les gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et de l'acide carboxylique se trouvent préférentiellement induits dans le corps fructifère, montrant ainsi que les besoins en carbone nécessaires au développement de l'ascocarpe et à la maturation des spores sont soutenus par le cycle du glyoxylate et la gluconéogenèse. Ce phénomène avait déjà été montré chez *Tuber borchii* (Gabella et al. 2005; Lacourt et al. 2002). En revanche, la phase symbiotique et donc l'ectomycorhize est marquée par l'induction préférentielle de gènes impliqués dans le transport transmembranaire et les processus métaboliques des hydrates de carbones et ceux des polysaccharides, ce qui souligne le rôle prédominant d'échanges de nutriments au sein de l'ectomycorhize (Chalot et al. 2002; Nehls et al. 2007).

2. Variations morphologiques dans le genre *Tuber*

D'un point de vue détermination des espèces du genre *Tuber*, historiquement, les variations morphologiques ont été les premiers critères utilisés. En d'autres termes, **le concept d'espèce morphologique (MSC) a été le premier concept utilisé pour déterminer les différentes espèces du genre *Tuber***. Bien que les différences morphologiques du genre *Tuber* se retrouvent durant les trois phases de son cycle, les différences morphologiques des mycéliums et des mycorhizes ne sont pas facilement utilisables pour une détermination précise. Tout d'abord, les mycéliums ne

sont pas facilement observables en conditions naturelles (*in situ*). De plus, même si la culture *in vitro* des mycéliums est possible, seule la vitesse de croissance semble être un indice de différenciation inter-espèce (Iotti et al. 2002). De plus, au sein de la même espèce, la vitesse peut différer entre souches (Saltarelli et al. 1999). Pour ce qui est de l'aspect morphologique des mycorhizes des espèces du genre *Tuber*, celui-ci dépend bien sûr du champignon mais aussi de la plante hôte et de l'environnement. On observe ainsi des morphologies de mycorhizes différentes pour la même espèce fongique selon les plantes hôtes et des conditions environnantes (Sisti et al. 2003), ce qui en fait un critère de détermination difficile à utiliser.

La majorité des études morphologiques pour différencier les espèces de truffes s'est alors faite sur le corps fructifère, l'ascocarpe. Concernant, l'ascocarpe (truffe proprement dite), ces différences morphologiques s'observent à différents niveaux : i) macroscopiques (taille de l'ascocarpe, couleur de la gleba, aspect du peridium) et ii) microscopiques (morphologie des asques et spores) (Figure 18). La taille du corps fructifère dépend bien sûr de l'environnement mais est aussi espèce-dépendant. En effet, certaines espèces comme *Tuber melanosporum*, *Tuber brumale*, *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum* ou encore *Tuber indicum* peuvent atteindre des diamètres dépassant la dizaine de centimètres. En revanche, les corps fructifères par exemple de *Tuber rufum* ou encore *Tuber asa* ne dépassent guère les 2.5 cm de diamètre (Chevalier and Frochot 2002). L'aspect du peridium fournit un critère d'identification morphologique complémentaire. En effet, certaines espèces comme *Tuber borchii*, *Tuber magnatum*, *Tuber puberulum* ont un peridium totalement lisse. En revanche, d'autres espèces comme *Tuber aestivum*, *Tuber melanosporum*, *Tuber brumale* etc. présentent de petites verrues. La grosseur, la striation et la forme de ces verrues constituent là encore des critères importants. En

effet, par exemple, les verrues de *Tuber mesentericum* sont plus petites que celles de *Tuber aestivum* et non transversalement striées (Chevalier and Frochot 2002). La couleur de la gleba mature constitue un autre critère morphologique macroscopique utile pour différencier les espèces *Tuber*. Il s'agit certainement du critère d'observation le plus employé. Au niveau des caractères microscopiques, les asques et l'aspect des spores sont deux critères hautement employés en détermination morphologique (Chevalier and Frochot 2002). Par exemple, l'ornementation des spores est un critère certes délicat mais qui peut s'avérer utile. Pour simplifier, trois types d'ornementation des spores de *Tuber* ont été définis : l'ornementation échinulé (truffes des groupes */melanosporum* et */rufum*), réticulo-alvéolée (groupes */aestivum* et */excavatum*) et échino-réticulo-alvéolée (pour *Tuber pseudoexcavatum*, *Tuber himalayense*) (Chevalier and Frochot 2002).



Figure 18 : Différences morphologiques entre espèces du genre *Tuber*.

(Bonito 2009)

3. *Différences moléculaires entre espèces du genre Tuber*

Outre les critères morphologiques utilisés pour identifier les espèces du genre *Tuber*, depuis les années 80, des techniques biochimiques et de biologie moléculaire ont été utilisées pour différencier les espèces de *Tuber*. En premier lieu, les critères moléculaires étudiés ont été les profils protéiques obtenus à partir de l'extraction de protéines totales (Mouches et al. 1981; Mouches et al. 1978). Ces profils ont permis d'avoir un aperçu général (une carte protéique) de l'ensemble des protéines des truffes. Grâce à cette technique, Mouches et collaborateurs ont pu distinguer différentes espèces et ainsi affirmer que chaque espèce avait son propre profil électrophorétique. Ainsi les espèces telles que *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, *Tuber melanosporum*, *Tuber moschatum*, *Tuber brumale* et *Tuber excavatum* ont pu être différenciées. Peu de temps après, avec un échantillonnage plus important, Dupré a pu confirmer ces résultats pour la majorité des espèces excepté pour *Tuber moschatum* et *Tuber brumale* qui semblaient être une seule et même espèce (Dupré et al. 1985). L'analyse des profils de protéines totales extraites des corps fructifères semblait donc utilisable pour différencier des espèces de truffes. En ce qui concerne les deux autres phases, mycorhizes et mycélium, les résultats ne sont pas aussi concluants (Dupré 1997). Les inconvénients importants de cette méthode sont la quantité importante de matériel biologique nécessaire ainsi que la fluctuation dans les résultats obtenus selon les conditions de conservation du matériel. Aussi, après cette technique une autre approche est apparue: les analyses d'isoenzymes. Les isoenzymes sont des enzymes ayant un substrat commun mais qui diffèrent par leur mobilité électrophorétique. Les isoenzymes peuvent être en fait l'expression de plusieurs gènes localisés sur plusieurs loci, l'expression de plusieurs allèles pour un même locus ou même l'expression des molécules résultant d'un changement de conformation post-

traductionnelle. C'est au congrès de Spoleto, en 1988 que Palenzona et collaborateurs ont présenté, pour la première fois, l'utilisation des isoenzymes pour identifier les espèces de *Tuber*. Par la suite d'autres auteurs ont réussi, avec cette même technique, à identifier certaines espèces de *Tuber* (Gandeboeuf et al. 1994; Pacioni and Pomponi 1989). Ces études présentent en plus de la possibilité de discrimination entre espèces, l'étude des relations phylogénétiques entre ces dernières.

Après l'utilisation des techniques biochimiques, en 1993, Lanfranco et collaborateurs ont été les premiers à utiliser les techniques de biologie moléculaire pour identifier les espèces de *Tuber* (Lanfranco et al. 1993). Ils ont utilisé la technique d'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe, la RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) et ont pu montrer une forte diversité interspécifique pour plusieurs espèces de truffes : *Tuber magnatum*, *Tuber albidum*, *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, *Tuber macrosporum* et *Tuber rufum*. D'autres études par la suite ont aussi utilisé la RAPD pour différencier les espèces de *Tuber*. Il apparaît cependant que les espèces présentant une forte diversité intraspécifique posent plus de problèmes pour l'identification (Gandeboeuf et al. 1997). Le principe de la RAPD reposant sur une amplification aléatoire avec des amorces assez courtes pour qu'elles s'hybrident facilement à divers endroits du génome, des contaminations de profils RAPD par d'autres organismes sont possibles. D'ailleurs, c'est pour cette même raison que cette méthode est inutilisable sur mycorhize (l'ADN de la plante est amplifié). D'autres techniques moléculaires ont donc été utilisées par la suite. C'est notamment le cas de la PCR dite « ciblée ». Cette technique consiste en une amplification d'un locus défini avec des amorces assez spécifiques pour qu'elles n'amplifient que le locus choisi. Le polymorphisme et la diversité interspécifique des *Tuber*, via la PCR ciblée, ont été mis en évidence chez *Tuber* par RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism)

(Henrion et al. 1994; Paolocci et al. 1999; Roux et al. 1999) puis par séquençage (Mello et al. 2002; Paolocci et al. 2004; Roux et al. 1999). Historiquement l'ADN ribosomique et notamment la région de l'Internal Transcribed Spacer (ITS) a été la région génomique la plus utilisée en taxonomie moléculaire des champignons et plus particulièrement du genre *Tuber*. La région ITS est située sur l'ADN nucléaire entre les gènes codant pour les sous-unités ribosomiques 18S, 5.8S et 25/28S (Figure 19). Plusieurs raisons ont motivé l'importante utilisation de ce marqueur : cette région est répétée plusieurs fois dans le génome donc plus facilement amplifiable, c'est un marqueur clé couramment utilisé à l'échelle inter-spécifique et une multitude d'amorces existent pour amplifier les organismes fongiques (Gardes and Bruns 1993; White et al. 1990).

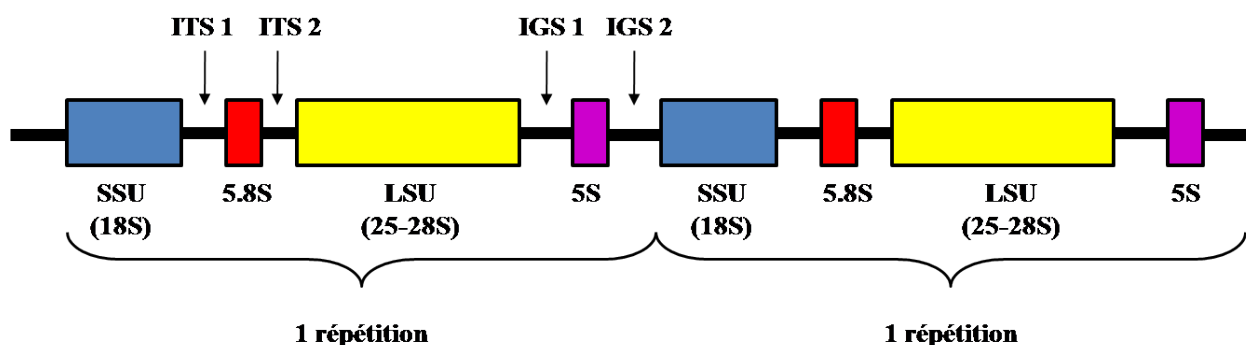


Figure 19 : Représentation schématique de la disposition de la région ITS, des sous unités ribosomiques 18S, 5.8S et 25/28S et de la région IGS.

Différentes études ont pu mettre en évidence les différences interspécifiques des espèces de *Tuber* par l'utilisation de l'ITS (Henrion et al. 1994; Mello et al. 2002; Roux et al. 1999). L'ITS a donc permis de différencier certaines espèces de *Tuber* entre elles. D'autres régions et marqueurs ont été depuis utilisés chez le genre *Tuber*

comme le gène codant pour la β -tubuline, le facteur d'élongation 1- α et ont également permis de mettre en évidence des différences génétiques interspécifiques (Paolocci et al. 2004). Au-delà d'une identification moléculaire, l'utilisation de marqueurs génétiques a permis de construire des phylogénies moléculaires au sein du genre *Tuber*. C'est ainsi que les reconstructions phylogénétiques ont permis de classer les différentes espèces et d'étudier leurs liens de parenté. Le concept d'espèce phylogénétique (PSC) a pris une place importante dans la systématique et est le concept le plus utilisé de nos jours pour établir une classification au sein du genre (Bonito et al. 2010a; Jeandroz et al. 2008). Cependant, malgré ces progrès, des ambiguïtés pour différencier certaines espèces subsistent encore comme par exemple entre *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* comme nous le verrons par la suite.

Outre les différences morphologiques et génétiques, les truffes de par leurs propriétés organoleptiques, présentent la caractéristique de dégager des arômes particuliers. Différentes études se sont donc intéressées aux composés organiques volatils qui pouvaient exister au sein des truffes.

C. Les composés organiques volatils :

1. *Que sont les composés organiques volatils (COV)?*

Ces composés odorants désignés souvent comme « arômes » sont des molécules organiques de faible masse moléculaire ($M < 400$ daltons). Ils ont la capacité de pouvoir se retrouver en partie à l'état de vapeur dans l'atmosphère gazeuse. Au contact de la muqueuse olfactive, ils provoquent ainsi un stimulus qui est ressenti par la personne et est assimilé à « l'arôme ». Parce que ces composés interagissent avec les récepteurs olfactifs des êtres vivants qui y sont sensibles, ils sont

ditions composés odorants, et sont, depuis 50 ans, le sujet d'études aussi bien mécanistiques, fonctionnelles, qu'évolutives (Hartmann 2007). Les COV font partie de ce qu'a nommé, en 1891, Albrecht Kossel, les « métabolites secondaires » qui désignaient alors tout composé produit par les plantes dont le rôle n'était pas impliqué directement dans les fonctions primaires (Hartmann 2007). On sait aujourd'hui que ces composés sont essentiels aux plantes et champignons, notamment pour la reproduction ou la survie, tout autant que les « métabolites primaires » (tels que les glucides, les lipides, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques). Les COV appartiennent à différentes classes des produits chimiques organiques tels que les hydrocarbures, alcools, aldéhydes, esters, cétones, amines, les composés chlorés, les composés soufrés ou encore les éthers. Pour un arôme naturel, on peut trouver plus d'une centaine de composés qui forment ainsi le rendu final. Ces composés n'ont par contre aucune valeur nutritive.

2. *Comment identifier les COV ?*

Plusieurs techniques existent pour extraire et analyser les COV d'intérêt.

Cependant, ces techniques suivent un même schéma constitué de deux grandes étapes. La première est **l'extraction des arômes** de l'échantillon d'intérêt. Cela peut se faire en phase liquide ou solide. Son but est d'extraire les COV, de les isoler et de les garder soit en milieu liquide avec un solvant soit sur une fibre. La seconde étape est **l'analyse des arômes**. Dans cette étape là, les différents composés sont séparés selon différents critères puis analysés.

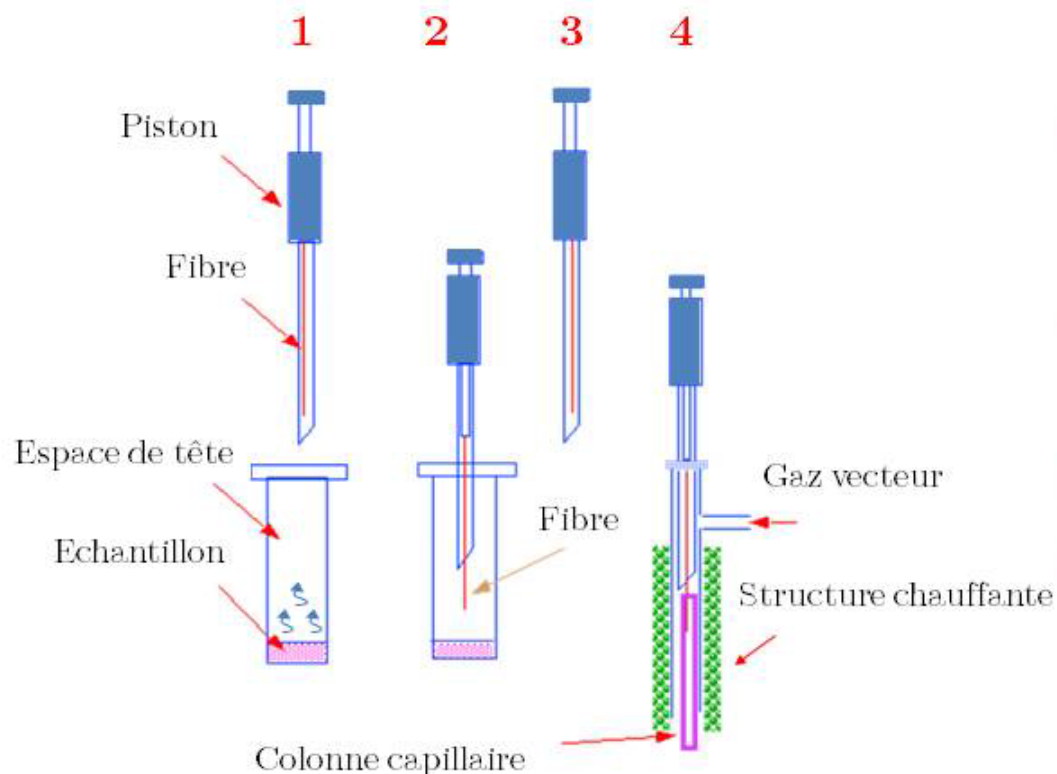
Parmi les techniques d'extraction, que ce soit en phase solide ou liquide et sur produit solide ou liquide, nous pouvons citer les extractions par concentration en espace de tête (statique ou dynamique) telles que le « purge and trap » et la SPME (micro

extraction en phase solide)(Arthur and Pawliszyn 1990). Il existe aussi des extractions de produits (solides ou liquides) nécessitant une chauffe comme la distillation (avec ou sans l'usage d'un solvant) telles que la « SAFE » (Solvent Assisted Flavour Evaporation) (Engel et al. 1999).

Pour la phase d'analyse (séparation des COV et leur détection), même si le plus courant est l'usage de la chromatographie gazeuse (GC) comme technique de séparation, d'autres existent comme la chromatographie en phase liquide par exemple. Pour l'identification, le détecteur à spectrométrie de masse est la technique la plus utilisée mais on peut citer le détecteur à ionisation de flamme, le détecteur à capture d'électron ou encore le détecteur olfactif (« e-nose »ou « sniffing »).

Nous allons détailler une technique simple et efficace qui est la plus couramment utilisée et sera utilisée dans le chapitre 3 : la technique d'extraction / analyse SPME-GC MS (micro extraction en phase solide analysée en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) (Arthur and Pawliszyn 1990). La micro extraction en phase solide (SPME) est une technique d'adsorption/désorption permettant de concentrer les COV d'échantillons qu'ils soient liquides ou gazeux (espace de tête) (Figure 20). Elle est basée sur le principe d'adsorption des COV par une fibre. L'adsorbant (phase stationnaire) se situe donc à la surface d'une fibre en silice fondue qui est de nature différente selon les composés à extraire. La phase stationnaire de la fibre peut être composée de polydiméthylsiloxane (PDMS), de polyacrylate (PA) (plus polaire) ou encore de polydiméthylsiloxane-divinylbenzène (PDMS-DVB). La fibre se situe sur une tige métallique d'une seringue. Différents paramètres sont à définir comme la polarité et la finesse de la fibre, le volume de l'échantillon, le temps d'équilibre (temps pendant lequel l'échantillon est

seul dans le flacon afin que l'espace de tête soit saturé en COV) ou encore le temps d'extraction (temps pendant lequel la fibre est avec l'échantillon). Après cette phase d'extraction, la fibre est ensuite thermo-désorbée dans l'analyseur pour l'identification. L'analyseur est la chromatographie gazeuse (GC) qui permet la séparation des COV par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse (souvent l'hélium) et une phase stationnaire appropriée (la colonne capillaire). Cette chromatographie gazeuse est couplée à un spectromètre de masse. Ce détecteur permet ainsi l'ionisation et la fragmentation des molécules ; cette détection étant basée sur le rapport masse/charge. Comme les fragmentations sont spécifiques pour chaque molécule, l'identification précise est possible. On compare alors la fragmentation obtenue pour chaque molécule à une base de données et on peut ainsi identifier la molécule d'intérêt.



(1) L'échantillon est placé dans un flacon hermétique pendant quelques minutes (temps d'équilibre) à une température donnée. Les COV peuvent ainsi se placer dans l'espace de tête du flacon.

(2) La fibre de silicone est alors introduite dans le flacon. Les COV sont alors adsorbés sur la fibre pendant un temps donné (temps d'adsorption - extraction) à une température définie.

(3) Une fois l'étape 2 achevée, la fibre se rétracte dans le piston pour être analysée en GC-MS

(4) Les composés, un par un, sont relargués *via* l'entraînement par un gaz vecteur (dans notre cas l'hélium) selon leur affinité avec lui (chromatographie gazeuse). Ils sont alors adsorbés dans une colonne capillaire. Ils vont ensuite être ionisés et pour chacun d'eux leur spectre d'ions sera analysé pour identifier leur nature (spectrométrie de masse)

Figure 20 : Schéma simplifié des étapes de l'analyse en SPME / GC-MS.

D'après : http://www.chromatography-online.org/rs_2/image063.gif

3. Les composés organiques volatils chez *Tuber* et leur importance

L'étude des COV des truffes remonte à une trentaine d'années avec de premières études descriptives qui ont essayé d'analyser les composés existant dans les truffes (Claus et al. 1981; Talou et al. 1987, 1989a, b; Talou et al. 1990). Plus de 200 COV ont été mis en évidence jusqu'à présent (Cullere et al. 2010; Diaz et al. 2003; Gioacchini et al. 2008; March et al. 2006; Mauriello et al. 2004; Splivallo et al. 2007; Splivallo et al. 2011; Zeppa et al. 2004) pour différentes espèces de truffes. Pour la majorité, il s'agit d'hydrocarbures contenant des groupements alcools, cétones, aldéhydes et sulfures. Un profil aromatique de truffe (à partir de l'ascocarpe) contiendrait de 20 à 50 composés différents (Cullere et al. 2010; Diaz et al. 2009; March et al. 2006; Splivallo et al. 2007).

L'origine des COV retrouvés en analysant les corps fructifères de truffes est encore sujet à discussion. En effet, par exemple, les séquences génomiques disponibles de *Tuber melanosporum* indiquent que les gènes synthétiseurs des composés retrouvés chez cette truffe sont présents dans le génome (Martin et al. 2010). Cependant, chez *Tuber borchii*, il semble que certains COV des corps fructifères de truffe ne soient pas retrouvés dans le mycélium pur (Splivallo et al. 2007). Les micro-organismes présents dans le sol et se retrouvant dans le corps fructifère de la truffe semblent jouer un rôle dans la production des COV (Buzzini et al. 2005).

Le rôle des composés organiques volatils des truffes n'a pas été totalement élucidé mais des pistes ont néanmoins été données. En effet, dans un article de synthèse récent, Splivallo et collaborateurs ont groupé les différents rôles des COV vis-à-vis des différents organismes (Splivallo et al. 2011). Il a été par

exemple montré que lors de l'interaction truffe/plante hôte, certains composés présents chez la truffe tels que l'éthylène et l'acide indole-3-acétique pouvaient moduler l'architecture racinaire de la plante (Splivallo et al. 2009). De même, les composés à 8 atomes de carbone (C8) présents chez la truffe, tel que le 1-octen-3-ol, à faibles doses, activent les gènes de défenses chez les plantes. En revanche, à fortes doses, l'effet produit est un stress oxydatif pour la plante. De même, certains composés organiques volatils ont un rôle important dans l'interaction truffes/ animaux. En effet, le diméthylsulfure (DMS) serait un composé attractif pour les animaux (Talou et al. 1990). Enfin, un autre rôle majeur des COV dans les interactions truffes/organismes est celui de la compétition vis-à-vis des autres champignons ectomycorhiziens. En effet, il a été montré que les COV de *Tuber melanosporum* aideraient, au sein du brulé, à réduire l'abondance des autres champignons mycorhiziens.

Entre les espèces de truffes, la teneur en certains COV peut être différente. En effet, certains composés se retrouvent quasiment dans toutes les espèces et d'autres sont quasi spécifiquement inféodés à une espèce en particulier. Dans une étude récente, Splivallo et collaborateurs ont comparé les occurrences de 8 composés dans la littérature pour 11 espèces de truffes différentes (Figure 21) (Splivallo et al. 2011). Il semblerait que le diméthylsulfure (DMS) ou encore le disulfure de diméthyle (DMDS) par exemple soient des composés universels car retrouvés chez la majorité des espèces. En revanche, le composé 2-méthyl-4,5-dihydrothiophene est uniquement retrouvé chez *Tuber borchii*.

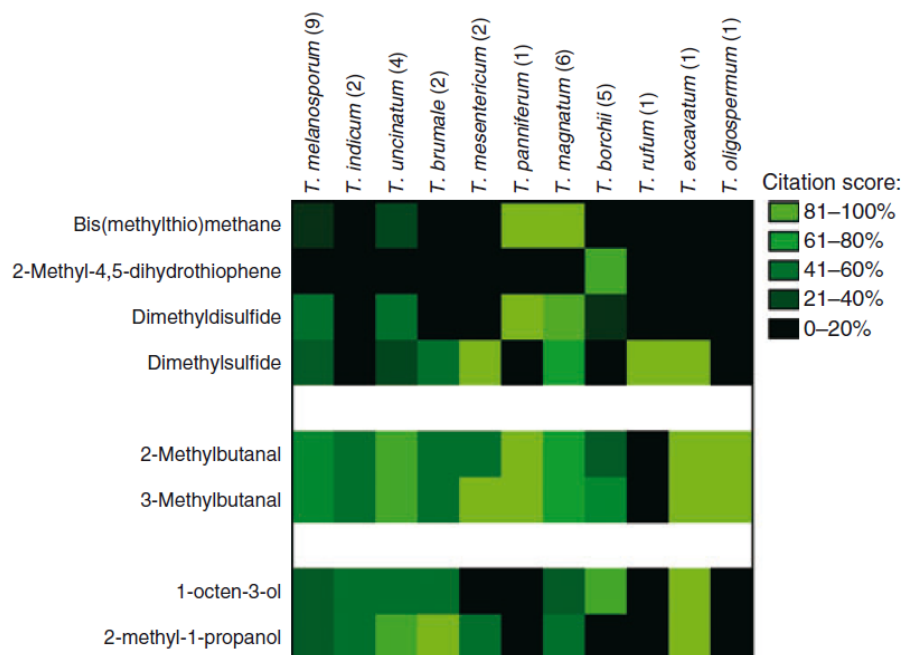


Figure 21 : Etude bibliographique de l'occurrence de quelques COV majeurs chez 11 espèces de *Tuber*

Les COV sulfures, aldéhydes et alcools rapportés dans 11 espèces de truffe sont indiqués. Le « citation score » est défini comme le nombre de fois où un COV a été rapporté pour l'espèce donnée sur le nombre total de publications (indiqué entre parenthèses à côté du nom d'espèce) depuis 1995.

Pour une espèce donnée, la variabilité des arômes peut être importante et significative que ce soit d'un point de vue qualitatif ou quantitatif (Gioacchini et al. 2008; Mauriello et al. 2004; Zeppa et al. 2004). Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette variabilité. Tout d'abord, certains facteurs extrinsèques comme le mode, le temps et la température de stockage peuvent influencer la composition en arômes des truffes (Bellesia et al. 2001). De même, des facteurs intrinsèques comme le degré de maturité de la truffe peuvent faire varier la composition en COV (Splivallo et al. 2007; Zeppa et al. 2004). Enfin une autre cause de variabilité en COV peut être la localisation géographique (Gioacchini et al. 2008). Une étude récente a montré que les composés en C8 seraient des composés majeurs des truffes et montrent une variabilité intra-spécifique. Cette dernière serait sous contrôle génétique (Splivallo et al. 2012).

III. Place socioculturelle de la truffe

A. Mythes autour de la Truffe : Toute une Histoire

Les premières évocations historiques autour de la truffe remontent à des millénaires. En effet, des tablettes d'argile sumériennes, en Mésopotamie, datant de 3700 avant JC, la mentionnaient déjà. Le mot « Tabarli » en langue sumérienne qui était parlée à cette époque entre le Tigre et l'Euphrate en Mésopotamie désignait « un champignon souterrain » qui était comestible et qui était tellement apprécié que les principales villes en faisaient commerce. En Grèce antique, la Truffe fait partie intégrante de la mythologie et tout un récit légendaire s'articule autour de sa création. En effet, selon les Grecs, les dieux de l'Olympe eux-mêmes furent à l'origine de la Truffe. Héphaïstos, dieu de la Forge, tira de son tablier en cuir une boule de houille à laquelle il donna couleur et substance. Dionysos, dieu notamment de la vigne et des excès lui offrit son renouvellement saisonnier. Aphrodite, déesse de l'amour et de la beauté, donna un soupçon de sublimité amoureuse. Ariane, douée de raison, l'enfouit sous une couche d'humus entre deux chênes. Zeus, dieu des Dieux, par un éclair, fertilisa la terre pour donner ainsi naissance à ce mystérieux champignon. On pense que les Grecs connaissaient différentes espèces de truffes. Cinq siècles avant notre ère, Pythagore vantait déjà les truffes de Lesbos. Un des auteurs romains les plus connus est sans nul doute Théophraste (372-287 av JC) qui voyait la Truffe comme le fruit de l'interaction entre la foudre et les pluies d'automne. D'autres auteurs romains comme Nicandre (IIème siècle avant JC), Dioscoride (I siècle avant JC), Pline l'ancien (23-79 après JC) et Plutarque (45-125 après JC), considéraient ce champignon comme le résultat

soit de la foudre, soit de la pluie d'orage, soit du limon venu du centre de la terre, soit des racines et ou encore de diverses callosités (Riousset et al. 2001). Chez les Romains, la truffe était très appréciée des gourmets notamment avec la dynastie des Apicius qui ont su donner à ce mets une attention toute particulière. Le dernier des Apicius a même envoyé des truffes et des huitres lors de la guerre contre les Parthes à Trajan. Lors du Moyen Age, des écrits relatent l'existence et la consommation assez controversée de ce champignon. En effet au Moyen Age, la truffe était plutôt vue comme un mets diabolique. Poussant dans le sol et de couleur noirâtre, elle était ainsi assimilée au fruit de Satan. Ses propriétés aphrodisiaques prétendues incrémentaient sa réputation malsaine. Un seul endroit durant cette période semble utiliser la truffe dans l'art culinaire : la cour du Pape en Avignon. Secrètement récoltée en Haute Provence, elle est cuisinée pour le Pape dans le plus grand secret et malgré la peur du satanisme. Ce n'est qu'à la Renaissance, que les plus grandes cours européennes se sont mises à déguster ouvertement ce champignon toujours en lui conférant des propriétés aphrodisiaques. Deux italiens Mattioli et Cesalpino ont été les premiers à décrire les truffes comme des champignons. Selon Montecchi et Lazzari, il s'agirait vraisemblablement de *Tuber melanosporum*, *Tuber rufum* et *Tuber aestivum* (Montecchi and Lazzari 1993). La truffe d'été, *Tuber aestivum*, fait intégralement partie de la table des rois de France et ce n'est que sous François 1^{er} que la truffe d'été et de Bourgogne furent remplacées par la truffe noire du Périgord, *Tuber melanosporum*. Finalement, tout au long de l'histoire de France, hormis au Moyen-Âge et pendant une courte période de la Révolution, la truffe est abondamment connue et citée. On avance même que la truffe aurait joué à plusieurs reprises un rôle historique et politique. Elle serait par exemple à l'origine de la naissance de Napoléon François Charles Joseph Bonaparte « Roi de Rome » (futur

Napoléon II), grâce à la recette qu'un officier de la garde donna à l'empereur Napoléon 1er. Ce grenadier ayant de nombreuses paternités, il les corrélait aux vertus des truffes qu'il dégustait. Au retour d'une permission, il en ramena à Napoléon 1^{er}. Neuf mois après, Marie-Louise mit au monde Napoléon II. La truffe a fait l'objet d'autres mythes comme ceux concernant ses propriétés médicinales. Certains médecins, comme le Docteur Devergie en 1849, prescrivaient à leurs patients de l'eau de truffe qui selon eux agissait contre les vomissements, diarrhées de cholérique, phtisie, gastralgies et bien d'autres maux (Callot 1999). De nos jours, de façon encore confidentielle, certaines entreprises pharmaceutiques extraient des molécules de la truffe qui auraient, paraît-il, des propriétés anti-cancéreuses.

B. Importance de la truffe

1. Intérêts gastronomiques et culturels

Comme nous avons pu le voir, la truffe a toujours pris une place spéciale durant l'Histoire. Ceci est sans doute dû à son intérêt aromatique et culinaire ainsi qu'à sa rareté qui fait d'elle un produit de luxe, validant l'adage « Tout ce qui est rare est précieux » (« La Chose est tant plus presieuse Come a trouver est plus penouse » (Isopet de Lyon, 50, 17) «E ogni cosa rara, Dicie un dicreto, ch'è tenuto rara » (Barberino) tous deux cités dans (Singer 1947). D'un point de vue gastronomique, à travers l'Histoire, les Hommes ont appris à la cuisiner grâce au savoir de grands noms de la cuisine comme Marcus Gavius Apicius, cuisiner officiel de l'empereur Tibère. Un grand nom de la gastronomie française, Brillat-Savarin, a su créer des plats la mettant en valeur (Brillat-Savarin 1825). La truffe se présente comme un mets délicat rentrant dans la composition de nombreux plats qu'elle sublime (Annexe 2). La

Truffe, qu'elle soit Truffe de Bourgogne, Truffe noire du Périgord ou Truffe blanche d'Alba fait partie intégrante de certaines régions de France et d'Europe (Espagne et Italie). Dans toutes ces régions, de nombreux événements existent pour la promouvoir d'un point de vue culturel comme les foires, les marchés. La truffe est aussi célébrée par l'existence d'associations et de confréries à travers les pays et les régions. En Côte d'Or par exemple, l'association « La Truffe Côte d'Or » tient le rôle de relais pour le syndicat des producteurs de truffes de la Côte d'Or, tant vis-à-vis de ses actions et objectifs qu'au niveau de sa reconnaissance par les instances interrégionales et nationales (<http://www.truffedebourgogne.asso.fr/>). De même, « La Confrérie de la Truffe de Bourgogne » contribue elle aussi, depuis 1994, à promouvoir la truffe de Bourgogne et son rayonnement par l'existence de manifestations (<http://www.confreriedelatruffedebourgogne.asso.fr/>).

2. La trufficulture

La trufficulture est la culture de la truffe. Différentes techniques et étapes sont menées en trufficulture afin d'optimiser la production, le cavage (récolte) et la commercialisation. C'est au début du 19^{ème} siècle que Joseph Talon mit au point la première technique de trufficulture (Hall et al. 2003). Il sema des glands récoltés sous un chêne truffier *Tuber melanosporum* et une dizaine d'année plus tard, de nombreuses truffes furent récoltées. Même s'il fut imité et copié, cette technique resta toutefois très aléatoire avec des résultats plus ou moins probants. Cependant, il est à noter que grâce à lui, la récolte de la truffe n'était plus seulement une simple cueillette comme pour d'autres champignons mais une récolte réfléchie et anticipée. A partir de ce moment, de nombreuses plantations truffières ont vu le jour et notamment après l'invasion du phylloxera dans les années 1870 qui poussa certains

viticulteurs à changer leurs vignobles en plantations truffières. *Tuber melanosporum* fut la première espèce *Tuber* cultivée mais nous verrons que d'autres espèces sont depuis cultivées. A partir du début du 20^{ème} siècle, la production de truffe baissa drastiquement (Lefevre and Hall 2001; Olivier 2000). Par exemple en France, elle passa de plus de 1000 tonnes par an au début du 20^{ème} siècle à moins de 100 tonnes par an en 2001 (*Tuber melanosporum* et *Tuber brumale* confondus) (Figure 22) (Hall et al. 2003). Différentes raisons peuvent être invoquées comme l'exode rural et les conséquences des deux grandes guerres par exemple.

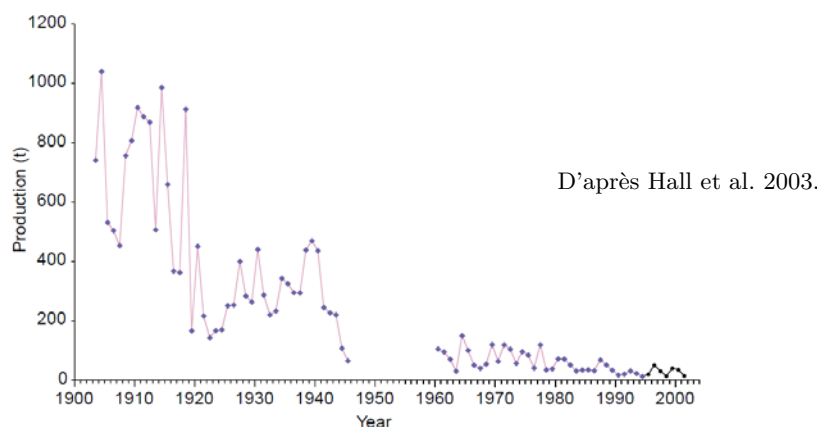


Figure 22 : Production de *Tuber melanosporum* et de *Tuber brumale* en France de 1903 à 2001.

Ce n'est que dans les années 1960/1970 que des techniques d'inoculation, plus scientifiques, donnèrent de meilleurs résultats. Les premières expérimentations d'inoculations de plants truffiers ont été menées par une équipe italienne en 1967 sur le modèle *Tuber maculatum* Vitt. / *Pinus strobus* L. (Fassi and Fontana 1967). En France, les premiers essais ont eu lieu sur *Tuber melanosporum* au sein de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand en 1970 en reprenant les découvertes fondamentales des Italiens (Chevalier and Grente 1979). De façon simplifiée, la technique de base consiste à inoculer soit les graines de plante-hôte soit les jeunes plantules avec les spores de truffes sur support de culture stérile.

L'apport d'inoculum se fait par une préparation à base de broyat de truffes (donc apport de spores). Cet inoculum est mis au contact des jeunes racines de plants hôtes (Chevalier et al. 1973). C'est la technique d'inoculation la plus employée par les pépiniéristes et est la plus efficace. D'autres techniques cependant existent pour inoculer les plants-hôtes comme l'apport d'inoculum via des racines porteuses de mycorhizes (technique d'inoculation par contact) (Chevalier and Grente 1973). L'inconvénient de cette méthode est le risque d'apporter des contaminations de la « plante-mère ». Enfin, une autre technique consiste à utiliser des cultures mycéliennes de truffes comme inoculum (Chevalier and Grente 1973; Fontana and Palenzona 1969; Palenzona et al. 1972). La production de mycéliums purs en grande quantité reste cependant le problème principal pour son utilisation à grande échelle. Elle reste tout de même utilisée en laboratoire. Côté plante, plusieurs essences végétales peuvent être utilisées pour la culture truffière. Le choix des espèces végétales se fait en fonction des préférences écologiques de l'espèce *Tuber* choisie mais aussi de celles de plante elle-même (Chevalier and Frochot 2002). En France, de façon générale, deux essences d'arbres sont les plus utilisées : les chênes (chêne vert (*Quercus ilex* L.) et chêne pubescent (*Quercus pubescens* L.) en région méridionale ; chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et chêne sessile (*Quercus petraea* Matt.) en climat plus tempéré) et le noisetier commun (*Corylus avellana* L.) adapté à tout climat mais qui est gourmand en eau. Le charme, le pin noir d'Autriche, le cèdre ou le tilleul sont également des plantes utilisées par les pépiniéristes pour produire des plants truffiers. Les plants, une fois inoculés poussent dans un substrat désinfecté et ayant les propriétés physico-chimiques appropriées au maintien de la mycorhization (Mannozi-Torini 1970). L'enjeu est d'éviter toute contamination par d'autres espèces fongiques tout au long de l'établissement de la symbiose. Une fois la colonisation

racinaire quasiment complète, les plants sont plantés en champs. Une autre phase de la trufficulture prend le relais : le maintien de la mycorhization et donc l'entretien de la truffière. Cette phase ne sera pas développée dans ce rapport, cependant il est important de citer que l'antécédent culturel de la truffière (Frochot et al. 1990), les conditions pédoclimatiques locales et le travail du sol et de la truffière sont des éléments importants en trufficulture.

Après les années 1970 et donc, après l'essor de la mise au point de plants truffiers, la commercialisation de ces derniers s'est effectuée, notamment sous licence INRA par la société AGRI-TRUFFE. Cette commercialisation et production à grande échelle a permis un regain en trufficulture, et de nos jours plusieurs pépiniéristes français sont producteurs de plants truffiers. En France, la Fédération Française de la Trufficulture (FFT) regroupe certains trufficulteurs et a pour rôle de coordonner les différents acteurs et partenaires de la filière trufficole. La FFT, depuis 1999 fait partie du Groupement Européen Tuber (GET) qui rassemble les principaux pays européens producteurs comme l'Italie et l'Espagne par exemple.

A travers cette partie, nous avons vu que la truffe prend une part importante, que ce soit sur un plan culturel et historique qu'économique avec la filière trufficole. Dans la dernière partie, nous allons voir plus en détails les caractéristiques de la truffe de Bourgogne *Tuber uncinatum*. Nous verrons également quelles sont ses propriétés et en quoi elles rendent cette espèce intéressante sur un plan génétique et aromatique.

IV. La Truffe de Bourgogne

Tuber uncinatum est communément appelée « Truffe de bourgogne ». Comme son nom l'indique, on la trouve en région Bourgogne mais pas seulement. Dans la prochaine partie, nous verrons tout d'abord que sa position taxonomique n'est pas clairement établie. Puis, nous verrons les diverses propriétés et caractéristiques du taxon.

A. Une taxonomie controversée

La truffe de Bourgogne a fait longtemps l'objet de débats et de discussions entre scientifiques à propos de sa position taxonomique. En 1831, Carlo Vittadini, mycologue italien de renom décrit une espèce *Tuber* qu'il nomme « *Tuber aestivum* », la truffe d'été. Comme son nom l'indique, c'est une espèce qui a sa période de maturité durant l'été, qui possède une glèbe claire avec un peridium foncé. Il la décrit comme étant présente communément en Europe. En 1887, Adolphe Chatin, botaniste français, décrit une nouvelle espèce de truffe qu'il nomme *Tuber uncinatum*. Cette espèce selon lui possède de petits crochets au sommet du réticulum des spores (d'où la dénomination « *uncinatum* » qui en latin signifie « crochet ») (Figure 23). Concernant son aspect général elle est très similaire à l'espèce de Vittadini : *Tuber aestivum*. Il la considère cependant comme une espèce à part. Il s'avérera par la suite que la présence de ces crochets n'est qu'un artefact de la membrane qui se replie légèrement au sommet. Cependant, ces « crochets » sont bien visibles chez *Tuber uncinatum*.



Figure 23 : Photographie de spores de *Tuber uncinatum*.

La flèche noire indique le « crochet ».

Depuis la description de Chatin, plusieurs opinions s'opposent quant à savoir si *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* sont deux espèces différentes ou la même espèce. D'un point de vue morphologique, généralement *Tuber aestivum* a une gleba de couleur plus claire que *Tuber uncinatum* à maturité. Les verrues du peridium sont de tailles moins importantes chez *Tuber uncinatum* et peu, voire non striées transversalement (Chatin 1887; Rioussset et al. 2001). Le réseau ornant les ascospores est plus développé et les alvéoles des spores mieux fermées et plus régulières chez *T. uncinatum* (Chevalier et al. 1979). La hauteur des alvéoles du réseau sporal semble plus petite chez *Tuber aestivum* que chez *Tuber uncinatum* (Rioussset et al. 2001). Cependant, ce critère semble fluctuer (Weden et al. 2005). L'aspect des mycorhizes et l'aspect du mycélium *in vitro* sont tout à fait similaires (Chevalier and Frochot 2002; Rioussset et al. 2001). L'une des différences majeures est leur période de maturité et des préférences écologiques. En effet, le type « *aestivum* » se rencontre plutôt dans le sud de l'Europe dans les zones de la Provence méditerranéenne (préférence méridionale). Sa période de maturité se situe entre juin et août. Au contraire, le type « *uncinatum* » se trouve majoritairement dans le Nord et plutôt en climat continental. Sa période de maturité est en automne (Chevalier 1979).

Au-delà des caractéristiques morphologiques ou écologiques, différentes études se sont intéressées aux possibles différences moléculaires sur le plan biochimique et génétique. Tout d'abord, comme nous l'avons vu précédemment, les premières études effectuées se sont basées sur l'analyse des profils protéiques. Une première étude a pu discriminer les deux taxons par analyse de l'extraction protéique totale (Mouches et al. 1981). Peu de temps après, Dupré et collaborateurs, avec plus d'échantillons ont réussi à séparer les deux taxons toujours via l'analyse monodimensionnelle des protéines totales (Dupré et al. 1985). Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse des isoenzymes a été la technique suivante utilisée pour discriminer les espèces *Tuber*. Concernant, les taxons *Tuber aestivum/uncinatum*, cette technique a été aussi utilisée. De façon générale, les différents auteurs n'ont pas pu discriminer ces deux espèces potentielles ou tout au plus ont avancé que *Tuber uncinatum* est une variété de *Tuber aestivum* (Dupré 1997; Gandeboeuf et al. 1994; Pacioni et al. 1993; Pacioni and Pomponi 1991; Urbanelli et al. 1998).

D'un point de vue génétique, l'une des premières études employant une technique de PCR aléatoire, a été celle de Gandeboeuf et collaborateurs (Gandeboeuf et al. 1997). Comme vu précédemment, ces auteurs ont utilisé une approche RAPD pour essayer de discriminer des espèces *Tuber*. Certaines espèces ont pu être différenciées, cependant, concernant *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum*, aucune discrimination n'a pu être faite. En 2002, Mello et collaborateurs ont eux, utilisé, comme approche de PCR aléatoire, des amorces « microsatellites » (Mello et al. 2002). Les amorces sont constituées d'une répétition de motifs et amplifient une région ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) entre deux microsatellites de mêmes motifs. Cette technique est très utilisée dans les études de diversité génétique (Reddy et al. 2002). En utilisant cette méthode avec 5 types d'amorces, Mello et al ont réussi à discriminer *Tuber*

aestivum de *Tuber uncinatum*. Dans cette même étude, Mello et al ont aussi employé une approche de PCR ciblée avec l'emploi du marqueur ITS. Là encore, les deux taxons ont pu être différenciés. Cependant, en 1994, une étude basée elle aussi sur l'ITS (avec RFLP) n'avait pas pu les différencier (Henrion et al. 1994). De même, en 2004, Paolocci et collaborateurs, utilisant le marqueur ITS, la beta-tubuline et le facteur d'élongation 1-alpha obtiennent les mêmes résultats. Il est impossible de discriminer les deux types par utilisation d'ITS, la tubuline et le facteur d'élongation. Ils concluent que ces deux taxa appartiennent à la même espèce (Paolocci et al. 2004). La dernière étude en date qui s'est intéressée à cette possible discrimination d'espèces est celle de Weden et collaborateurs en 2005. Combinant des observations morphologiques avec l'utilisation du marqueur ITS, les auteurs concluent qu'il s'agit de la même espèce (Weden et al. 2005). Depuis 2005, il a été tacitement admis l'emploi unique de *Tuber aestivum* par certains scientifiques. Cependant, ce statut d'espèce unique est encore controversé et sera l'objet du premier chapitre de ma thèse (**Chapitre 1**).

B. Propriétés diverses

1. Propriétés écologiques

Comme énoncé plus haut, *Tuber aestivum* aurait une préférence écologique pour le climat méridional alors que *Tuber uncinatum* serait trouvée préférentiellement en milieu plus continental (Chevalier 1979). Si l'on considère le taxon « *Tuber aestivum/uncinatum* » dans son ensemble, on s'aperçoit que ce taxon a une grande aire de répartition géographique et donc écologique. En effet, on le trouve dans toute l'Europe et même plus, certains spécimens étant retrouvés naturellement en Suède (Weden 2004), en Espagne, en Italie, en Afrique du Nord (Jeandroz et al. 2008) et même en Chine (Song et al. 2005).

Ce taxon se développe sur des terrains d'âges géologiques assez variés. En effet, par exemple on le retrouve au Nord-est de la France, sur des terrains sédimentaires datant du Mésozoïque (Jurassique/Crétacé) et plus au centre, en Auvergne sur des formations cénozoïques (Chevalier and Frochot 1987). Il suffit que le substratum soit assez calcaire ou du moins riche en calcium échangeable. Cependant, la teneur en calcium du sol semble être un facteur moins important pour *Tuber aestivum-uncinatum* que pour *Tuber melanosporum*. Concernant les préférences écologiques du taxon, généralement, outre la teneur en calcium échangeable, le pH du sol est supérieur à 7 avec une disponibilité importante en matière organique (Tableau 5). *Tuber aestivum-uncinatum* ayant une grande aire de répartition naturelle, on s'aperçoit vite que la sensibilité à la température n'est pas aussi grande que pour *Tuber melanosporum*. Cependant, *Tuber aestivum-uncinatum* semble être très sensible aux sécheresses estivales (Chevalier and Frochot 1987). Enfin, *Tuber aestivum-uncinatum* est capable de mycorhizer diverses essences d'arbres. En effet, en conditions naturelles, on la retrouve par exemple aussi bien associée avec le chêne pubescent (*Quercus pubescens*), le hêtre (*Fagus silvatica*), le noisetier commun (*Corylus avellana*), le bouleau (*Betula verrucosa*) et divers pins (*Pinus nigra nigricans*, etc...) (Chevalier and Frochot 2002; Rioussset et al. 2001). *Tuber aestivum-uncinatum* se développe en fait avec les espèces végétales les mieux adaptées pour un endroit donné. Un taxon ayant donc une répartition aussi vaste au sein d'écosystèmes qui peuvent être différents pourrait posséder un degré de polymorphisme important. Si, comme nous l'avons vu, de nombreuses études ont été menées sur la différenciation entre *Tuber aestivum-uncinatum*, aucune étude n'a été menée à large échelle sur la différenciation génétique entre populations de *Tuber aestivum-uncinatum*. Cette large aire de répartition nous amène donc à nous poser la question : quel degré de

polymorphisme existe-t-il au sein de ce taxon ? Cette partie fera l'objet du second chapitre de la thèse (**Chapitre 2**).

Tableau 5: Caractéristiques physico-chimiques des sols de truffières naturelles à *Tuber uncinatum*

(Chevalier and Frochot 1987)

%	
argile	13.6 - 63.6
limon fin	11.3 - 49.7
limon grossier	6.0 - 26.6
sable fin	1.7 - 15.1
sable grossier	0.6 - 54.0
pH	7.1 - 8.0
matières organiques	44 - 211
C	26 - 124
N	3.44 - 7.63
C/N	8.43 - 20.4
CaCO3 total	4 - 710
Mg échangeable	0.23 - 2.80
K échangeable	0.16 - 0.90

Ce taxon est bien sûr retrouvé en conditions naturelles mais aussi de nombreuses plantations ont été mises en place ces dernières années à travers l'Europe. En effet, après la mise au point dans les années 1970 des méthodes d'inoculation de plants truffiers sur *Tuber melanosporum*, ces méthodes ont été appliquées sur *Tuber aestivum-uncinatum*. Bien qu'il faille respecter certaines préférences écologiques pour que *Tuber aestivum-uncinatum* puisse se développer, la culture de ce taxon en plantation semble être relativement assez aisée. Ce taxon semble s'adapter assez facilement à diverses conditions, ce qui mène quelquefois à une compétition entre ce taxon et *Tuber melanosporum*. Dans de précédentes études, il a été démontré que *Tuber aestivum-uncinatum* pouvait remplacer *Tuber melanosporum* en plantation. Ce dernier point fera partie de la 4^{ème} partie de ma thèse avec l'analyse de 30 ans de données d'une truffière plantée avec *Tuber melanosporum* (**Chapitre 4**).

2. *Propriétés aromatiques*

Précédemment, nous avons pu voir ce que sont les composés organiques volatils (COV) et quels sont leurs rôles chez les espèces du genre *Tuber*. Nous avons vu également que la variation en COV au sein d'une même espèce pouvait dépendre de plusieurs facteurs (Gioacchini et al. 2008; Mauriello et al. 2004; Splivallo et al. 2011; Zeppa et al. 2004). Une étude très récente s'est intéressée à la variabilité intraspécifique des COV de *Tuber aestivum-uncinatum* à différentes échelles et comment cette variabilité était dépendante de la diversité génétique, de la maturité des ascocarpes et de l'origine géographique (Splivallo et al. 2012). Cette étude très complète a tout d'abord démontré qu'aucun COV ne pouvait discriminer *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum*. De plus, quatre groupes majeurs de COV ont pu être identifiés au sein des populations de *Tuber aestivum-uncinatum* : 2-butanone, les composés en 8 atomes de carbones (composés C8), le 2-methylbutanal / 3-methylbutanal et le dimethylsulfate. Le groupe des composés C8 (avec prédominance du composé 1-octen-3-ol) semble être celui qui explique le mieux la variabilité entre les individus *Tuber aestivum-uncinatum*. De plus, la variabilité en composés C8 semble liée à la variation génétique. En revanche, la variabilité en COV ne semble pas être expliquée par le degré de maturité des individus. La troisième partie des résultats se focalisera sur la variabilité aromatique de *Tuber aestivum-uncinatum* à une échelle locale (**Chapitre 3**).



Chapitre I :

Etude de la différenciation génétique entre *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* par une approche multi-marqueurs.



Chapitre I : Etude de la différenciation génétique entre *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* par une approche multi-marqueurs.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de la différenciation entre *Tuber aestivum* (la truffe d'été) et *Tuber uncinatum* (la truffe de Bourgogne). Depuis plusieurs siècles, un doute persiste sur leurs places taxonomiques respectives et le fait qu'elles pourraient être une seule et même espèce ; certains résultats tant sur un plan morphologique que moléculaire menant à des conclusions opposées.

Nous avons décidé d'utiliser une approche génétique par l'emploi de marqueurs clés pour étudier de possibles différences entre les deux taxons. Pour cela, nous avons repris certains marqueurs déjà utilisés dans de précédentes études comme le gène codant pour la beta-tubuline, le gène codant pour le facteur d'élongation 1-alpha et le marqueur ITS (Internal Transcribed Spacer). A ces marqueurs, nous en avons rajouté certains : les marqueurs de la petite et de la grande sous-unité ribosomique nucléaire (respectivement nuSSU et nuLSU), de la petite et de la grande sous-unité ribosomique mitochondriale (respectivement mtSSU et mtLSU) et le gène qui code pour la plus large sous-unité de la ARN polymérase II (RPB2). Nous avons utilisé 26 échantillons, issus de divers pays européens, qui ont été caractérisés soit comme « *Tuber aestivum* » soit comme « *Tuber uncinatum* » sur la base de critères morphologiques. Après amplification et séquençage, des analyses phylogénétiques et de coalescence ont été effectuées ainsi que le calcul d'indices usuels de diversité. Enfin, un test de corrélation entre la distance génétique et géographique a été effectué.

Toutes ces analyses montrent qu'il n'existe pas de différenciation spécifique entre les deux taxons. Un certain polymorphisme peut être néanmoins observé et mérite d'être étudié plus précisément dans le futur. Ces résultats confirment notamment la conclusion de Weden en 2005 que *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* sont conspécifiques. D'un point de vue nomenclature, *Tuber aestivum* ayant été décrit avant *Tuber uncinatum*, l'usage voudrait que « *Tuber aestivum* » soit le nom retenu. Ces résultats sont importants notamment sur un plan commercial. En effet, *Tuber aestivum* (la truffe d'été) est perçu comme une truffe de qualité médiocre par rapport à *Tuber uncinatum* par les consommateurs. De ce fait, avancer qu'il s'agisse de la même espèce pourrait poser des problèmes sur le plan de la commercialisation. Il sera important de réfléchir sur la mise en place de labels (de type AOC ou AOP) pour valoriser non pas l'un des deux « taxons » mais la qualité de la truffe récoltée durant sa période de maturité optimale associée avec une provenance géographique explicitée.

Ce chapitre a été rédigé sous forme d'une publication scientifique actuellement soumise à la revue « *Organisms, Diversity and Evolution* ».

Article 1 : A multigene phylogeny demonstrates that *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* are conspecific.

Article soumis au journal “Organisms, Diversity and Evolution” (a peer-reviewed journal)

Molinier Virginie¹, van Tuinen Diederik¹, Chevalier Gérard², Gollotte Armelle³, Wipf Daniel¹,
Redecker Dirk¹

A multigene phylogeny demonstrates that *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* are conspecific

¹ UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/Université de Bourgogne, Pôle « Interaction Plantes-Micro-organismes » ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² Résidence Cristelle, Cournon d’Auvergues, France

³ Inoplant, 13 rue des Souhairs, 21110 Aiserey, France.

Corresponding authors:

Virginie Molinier

virginie.molinier@diyon.inra.fr,

Phone number: +33(0)380693567

Fax number: +33(0)380693753

Abstract

For almost two centuries it has been disputed whether *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* constitute two different species of truffles. Molecular markers have been applied previously to contribute to resolve this question, coming to different conclusions. In this study, we address this question by analyzing the genetic structure of truffles assigned to either of the two putative species from a geographically broad sampling across Europe. We used an approach involving multigene phylogenies and coalescent analyses of nine regions from five genes. All tests conducted supported the conspecificity of *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*.

Keywords

Phylogenetic analyses, Multi-marker study, *Tuber uncinatum*, *Tuber aestivum*

Introduction

The family *Tuberaceae*, described for the first time in 1822 (Du Mortier 1822) comprises seven genera, among them *Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg (Bonito et al. 2013). The commonly named “true truffles” belong to this genus. The latter exclusively includes hypogeous fungi which establish symbiotic relationships (ectomycorrhizae) with different host trees within the *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae*, and even within family *Tiliaceae*. In the genus *Tuber*, according to the *Index Fungorum*, more than 225 taxa are recognized (Jeandroz et al. 2008). In Europe, about thirty species have been found and described. Due to their famous organoleptic properties, some of them, such as *Tuber magnatum* (the Alba truffle) and *Tuber melanosporum* (the Périgord truffle) have high economic values. *Tuber* species have generally been

differentiated and named based on ascomata and their phenotypic characteristics, using morphological features of asci and spores. But, with the increasing use of molecular tools in biology, species identification is usually supported by phylogenetic approaches. Nevertheless, even if new classifications based on molecular markers of the family *Tuberaceae* and the genus *Tuber* have recently been proposed, (Bonito et al. 2010a; Jeandroz et al. 2008), ambiguities in species delimitation and phylogenetic placement remain for some species. *Tuber aestivum* Vittad. (the Summer truffle), for instance, described for the first time in 1831 by Carlo Vittadini (Vittadini 1831), and commonly present in Europe, has a maturation period during the summer and a light brown gleba (spore-bearing) with a black peridium. However, in 1887, Adolphe Chatin, described a new truffle species, *Tuber uncinatum* Chatin. (the Burgundy truffle), very similar to *T. aestivum* (Chatin 1887). According to his description, the new species mainly differed from *T. aestivum* by the presence of hooks in the spore reticulum. This criterion was later shown to be an artefact but during more than two centuries, scientists were divided concerning the taxonomic classification of *T. aestivum* and *T. uncinatum* as other morphological and ecological criteria suggested considerable differences between those two taxa (Chevalier and Frochot 1997; Rioussset et al. 2001). Other morphology-based studies concluded that *T. uncinatum* and *T. aestivum* constitute a single species (Gandeboeuf et al. 1994; Mouches et al. 1981; Urbanelli et al. 1998). Using molecular marker genes, three major studies have focused on possible genetic differentiation between the two putative taxa. In 2002, Mello *et al.* using phylogenetic analyses mainly based on the Internal Transcribed Spacers (ITS), assigned the two forms to two different taxa (Mello et al. 2002). Paolocci et al. (2004), using RFLP analyses, ITS, beta-tubulin and Elongation factor alpha sequences from a subset of the samples, concluded that they belong to a single species. The samples analyzed by Mello et al. (2002) and Paolocci et al.

(2004) originated mostly or even exclusively from Italy, therefore it seems unlikely that the whole genetic diversity of the two forms across their geographic range from Sweden to Spain through central Europe was addressed in these studies. Wedén et al. (2005) analyzed possible correlations between the spore reticulum (which is the morphological character commonly used to distinguish "*T. aestivum*" and "*T. uncinatum*") and ITS sequences in a broader geographical sample of fruit bodies. These authors came to the conclusion that the spore reticulum is not a useful diagnostic character and that "*T. aestivum*" and "*T. uncinatum*" were intermingled in the phylogenies, thus indicating conspecificity.

The contrasting conclusions obtained in three cited studies may have been due to the differences either in the geographic origin of the samples, the number of phylogenetic markers used or to the phylogenetic methods used. It is evident that a limited geographic sampling area can bias results towards genetic homogeneity. The small number of marker genes used may not have provided sufficient resolution for all taxa analyzed or may have resulted in weakly supported phylogenies. Indeed, gene history cannot always be equated to species history, for instance due to horizontal gene transfer, deep coalescence or gene duplication (Maddison and Knowles 2006).

Due to the difficulties using morphological and biological species concepts in fungi, but widely useful for many plants and animals, phylogenetic species recognition approaches have been proposed for fungi, requiring DNA sequences of multiple marker genes (Taylor et al. 2000). The advantage of these approaches is that they define precise tests for the probability that two taxa are conspecific.

It has to be stated that in spite of the long debate over the conspecificity of "*T. aestivum*" and "*T. uncinatum*", this question to date has not been stringently addressed using multiple marker genes and a sufficiently broad geographic sampling. Therefore, our goal was to investigate the genetic

diversity among *Tuber* samples assigned either to the “*T. aestivum*”-morphotype” or to the “*T. uncinatum*” morphotype” by robust and powerful methods using multiple marker genes. *Tuber* ascomata were sampled from numerous European locations, and we performed a range of phylogenetic analyses using nine different genetic markers from five genes commonly used for phylogenetic analysis. We used the robust Maximum likelihood and Bayesian inference methods for phylogenetic analyses and performed coalescent analyses, which are powerful tools to infer species history. Finally, several tests were used to study the potential genetic structure and geographic correlation within the sampling.

Materials and methods

Sampling, amplification and sequencing

Fungal samples were prepared from 26 *exsiccata* coming from natural habitats and previously assigned to either ‘*T. aestivum*’ or ‘*T. uncinatum*’ according to morphological criteria. Morphological aspects of spores were characterized, including spore dimensions and the reticulum and alveole shape (Chevalier et al. 1979). A lower reticulum height and less regular alveoles were considered to be characteristic for *T. aestivum*. Two outgroup taxa *T. macrosporum* and *T. magnatum* were added. Details about the samples analyzed are provided in Table 1. The *exsiccata* were deposited in the herbarium of the University of Lille (LIP). Genomic DNAs of the ascomata were isolated from 20 mg of dried gleba of each sample using DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Extracts were eluted in 190 µl of Buffer AE supplied in the kit. DNA concentration was estimated using a NanoDrop (Thermo Scientific) spectrophotometer. Nine different loci were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) from ascoma extracts: the Internal

Transcribed Spacers 1 and 2, a fragment each of the nuclear ribosomal large subunit (nu LSU), the nuclear ribosomal small subunit (nu SSU), the mitochondrial ribosomal large subunit (mt LSU), and of the mitochondrial ribosomal small subunit (mt SSU), the beta-tubulin (*β-tubulin*) gene, the elongation factor 1- α (*EF1 α*) and of the *RPB2* gene which encodes the second largest subunit of RNA polymerase II (*RPB2_7_11*). All PCR amplifications were performed using 50 ng of template DNA in a final volume of 20 μ l containing 10 X PCR Buffer (Invitrogen), 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.125 mM each of dNTP, 0.5 μ M each of forward and reverse primer and adjusting volume with sterile water. For each locus, primer sequences, MgCl₂, DMSO and BSA concentrations (if added) and cycling conditions are listed in Table 2. One-directional Sanger sequencing was performed by GATC biotech (Konstanz, Germany). Sequences were edited and manually trimmed using BioEdit 7.0.5.3 (Hall 1999). Sequences were queried against the NCBI public database GenBank by use of the BLASTN algorithm (Altschul et al. 1990) to verify that sequences were from *Tuber* or closely related to it for markers lacking *Tuber* reference sequences.

Sequence alignments and Phylogenetic analyses

Sequences were aligned using Clustal W program (Thompson et al. 1994) and manually corrected. DNA sequences generated in this study have been deposited in EMBL as accessions HE601903-HE601930 and HE602558-HE602780. Firstly, alignments from each gene were used to perform phylogenetic analyses using in parallel Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). Secondly, all sequences from the different genes for each sample were concatenated together in a supermatrix to perform multigenic analyses using Mesquite v.2.75 software (Maddison and Maddison 2011). ML and BI were also used for this global analysis. Models of sequence evolution for the nine genes separately and also for the supermatrix data set

were evaluated using the program JModel Test (Posada 2008). Negative log-likelihoods of different models of nucleotide substitution were compared using the Akaike Information Criterion (AIC) model selection criterion (Posada and Buckley 2004). Maximum Likelihood and Bayesian analyses were inferred using PhyML 3.0 online (Guindon et al. 2010) and MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003), respectively. Branch support was assessed by using the nonparametric bootstrapping under Maximum Likelihood and posterior probabilities were assessed under Bayesian inference. Detailed information on the implementation of all phylogenetic methods is listed in Supplementary Table 1.

Incompatibility of the phylogeny obtained from the data with the hypothesis of monophyly of *T. aestivum* and *T. uncinatum* was assessed using the Wilcoxon signed rank test (Templeton 1983) as implemented in PAUP*4.0 (Swofford 2002).

Coalescent analyses

The software BEAST was used to perform coalescent analysis gene by gene but also with the supermatrix data (Drummond and Rambaut 2007; Drummond et al. 2012). For all cases, a relaxed clock with an uncorrelated lognormal distribution (Drummond et al. 2006) and a coalescent constant size process as tree prior were used. We performed two independent runs for 150 millions of generations, sampling every 1000 generations, 10% of which were discarded as burn-in. To check for convergence (ESS > 200), Tracer software (Rambaut and Drummond 2007) was used. The results were obtained in the TreeAnnotator software (Rambaut and Drummond 2006) and visualized in Figtree (Rambaut 2009).

Diversity indices: Polymorphism vs. Divergence

The 26 “*T.aestivum-uncinatum*” samples were analyzed according to the two putative taxa “*T.aestivum*” and “*T. uncinatum*”. For each independent analysis, the polymorphism within each

group and the degree of divergence between them and toward each outgroup taxon were calculated.

For each target locus and for the supermatrix, diversity indices (polymorphic sites (v), singleton variable sites (s), haplotype diversity (H), nucleotide diversity (π), and Fst) were calculated to study the polymorphism within each of the two target groups (*T. aestivum* and *T. uncinatum* groups) (polymorphism) and the genetic divergence between them and the outgroup taxa (divergence). All the diversity indices were calculated using DnaSP v5 software (Librado and Rozas 2009).

Structure analyses

Structure software was used to determinate the potential numbers of clusters existing in our data without an *a priori* point of view. Structure estimates the log probability of the data for each value of K (number of clusters). A series of independent runs were performed by using K = 1-25 populations, a burn-in of 40,000 Markov chain Monte-Carlo (MCMC) iterations and a data collection period of 1,500,000 MCMC iterations. We used the admixture model in which the fraction of ancestry from each cluster is estimated for each individual. Each simulation of K was replicated 20 times. K was chosen on the basis of the second order rate of change of the log likelihood function (ΔK) with respect to K. ΔK was plotted against K (Evanno et al. 2005).

Geographical correlation test

A Mantel test was performed here using XLSTAT (Addinsoft, New York City, NY, USA) to study the correlation between the genetic distance and geographical distance within the “*T.aestivum/uncinatum*” group including the 26 individuals. The genetic distance matrix was obtained using Mega v.5 (Tamura et al. 2011) by a pairwise comparison for each couple of

sequences. The geographical distance matrix was obtained using the number of kilometres between two samples (i.e their respective location) via their respective global positioning system (GPS). Ten thousand random permutations were performed during this test.

Partition Homogeneity Test

To test for significant non-congruence among the different marker genes, a Partition Homogeneity Test was performed using PAUP*4.0 (Swofford 2002). The test was performed between the following partitions: nuclear ribosomal gene regions, beta-tubulin, EF1- α , rpb2 and mitochondrial ribosomal genes.

Results

Amplification, Phylogenetic and Coalescent analysis

For *Tuber aestivum-uncinatum* samples, fragments of 519, 648, 791, 287, 252, 356, 536, 670 and 663 bp were amplified from ITS1 and ITS2, the nuLSU gene, the nuSSU gene, the mtLSU gene, the mtSSU gene, the β -tubulin gene, the EF 1- α gene and the RPB2 7-11 genes, respectively.

PCR amplifications were successful for all isolates and genes except for the amplification of the β -tubulin gene from *T. macrosporum*. This was coded in the supermatrix as “missing data”.

For the ITS1 and ITS2, it was necessary to add DMSO (10%) to obtain sequences of good quality which indicates a high GC content which is confirmed by sequence analyses (Table 3a). These results are congruent with Paolocci et al. (2004). In the combined (concatenated) dataset matrix of the 26 taxa consisting of 4722 characters, 103 sites were polymorphic (2.18%) and 64 were singleton variable sites.

In some cases, polymorphism for a given gene was very low, resulting in a lack of resolution in the phylogenetic trees (see Suppl. Fig 1). Clusters of sequences found using one gene were rarely

recovered with another gene and generally relatively poorly supported. The partition homogeneity test showed significant discordance ($P=0.01$) between the phylogenies based on nuclear ribosomal genes and EF 1- α , but not for any of the other possible combinations. It has been disputed whether genes giving discordant phylogenetic signals can be analyzed together (Cunningham 1997), in any case we chose to present the results of the concatenated dataset (Figure 1) side by side with the single gene phylogenies, some of which have a low resolution. In the phylogenetic analyses for genes concatenated in a super matrix, maximum likelihood and Bayesian trees showed the same topology (Figure 1). A single tree is presented with the bootstrap values and posterior probabilities greater than 70% and 0.95 respectively. Neither trees from the concatenated dataset nor the single-gene phylogenies showed a separation of "*T. aestivum*" and "*T. uncinatum*" or only larger clusters exclusively composed of one or the other type. In fact both types appear to be randomly distributed over the trees. The Wilcoxon signed-rank test showed that parsimony trees obtained under the constraint of monophyletic "*T. uncinatum*" and "*T. aestivum*", respectively, were significantly worse ($P<0.026$) than those obtained without the constraint regardless of whether.

For the gene by gene analysis, different topologies have been obtained (Supplementary Figures 1) but in the majority branches within the *aestivum-uncinatum* cluster were not well supported in ML and in BI.

Regarding phylogenetic analyses for genes concatenated in a super matrix, maximum likelihood and Bayesian trees were identical with the same topology (Figure 1). A unique tree is presented with the bootstrap values and posterior probabilities greater than 70% and 0.95 respectively. EF 1- α sequences were included.

Coalescent analyses were performed for 150 millions of generations (two independent runs). The coalescent analyses conducted with the concatenated super matrix data resulted in the same topology as the phylogenetic analyses (Figure 2). Only two samples (F25 and E43), were related to the group 1 in the coalescent analyses and with the group 2 for phylogenetic analyses. Analyses of single genes resulted in different topologies of low support (Supplementary Figures 2)

Diversity indices calculation

Regarding the genetic diversity of the 26 samples within *T. aestivum* group, and when taking into account each target locus, the diversity indices such as polymorphic sites, the haplotype diversity and nucleotide diversity were low (Table 3a). Indeed, on average, we found an average of 2.35% variable sites (from 0.35% for mtSSU to 6.75% for ITS1). The values ranged from 2 to 20 for the number of haplotypes with on average 8.33 haplotypes per locus. The average of the nucleotide diversity was 0.005, ranging from 0.00027 to 0.020. We observed a heterogeneity in the genetic diversity between target loci. Mitochondrial DNA seemed to be more stable in this taxon than nuclear DNA. Indeed, few haplotypes were observed for the mt SSU and mt LSU with the weakest nucleotide diversity of the nine markers analysed. This is congruent with previous results dealing with *T. aestivum* (Guillemaud et al. 1996). ITS1 and ITS2 showed the highest nucleotide diversity values in our analysis, with ITS1 being more variable than ITS2. Regarding the protein-coding regions, on one hand, the elongation factor 1 α gene showed a considerable degree of polymorphism with 20 different haplotypes for 26 total individuals with a nucleotide diversity reaching 0.00756. On the other hand, the β -tubulin gene and RPB2 7-11 gene had a very low nucleotide diversity (0.00156 and 0.00219 respectively) with only 5 and 4 haplotypes, respectively. This relative heterogeneity between different protein gene coding regions confirms

the usefulness of multigenic analysis to avoid interpretation errors. The super matrix data analysis confirmed the low diversity within this fungal group with only 103 out of 4722 variable sites (2.18%) and a nucleotide diversity per site reaching 0.00383. However, no two samples showed identical sequences, thus each haplotype was unique (e.g. haplotype diversity = 1.0). When comparing the *T. aestivum-uncinatum* group with *T. macrosporum* and *T. magnatum* (Table 3b), the supermatrix showed a divergence of 9.68% and 9.28%, and 10.57% between *T. macrosporum* and *T. magnatum*, respectively. These three different species are well differentiated using the molecular tools.

We used the fixation index, F_{ST} , which is an estimation of population differentiation by measuring the diversity of randomly chosen alleles within the same sub-population relative to that found in the entire population. It is often expressed as the proportion of genetic diversity due to allele frequency differences among populations. This comparison of genetic variability within and between populations is frequently used in the field of population genetics, with values range from 0 to 1. A zero value implies complete panmixis; that is, that the two populations are interbreeding freely, and a value of one would imply the two populations are completely separate.

When the different values were calculated between “*aestivum pre-assigned group*” and “*uncinatum pre-assigned group*” the F_{ST} values were very weak (from 0 to a maximum of 0.06) (Table 3c). According to Wright’s diversity scale, those values indicate no differentiation between these two potential populations.

Genetic structure analysis and Geographical correlation test

After performing structure analysis according to the method by Evanno *et al*, (2005), two clusters were defined without an *a priori*. Nevertheless, ΔK values were very weak with low

differences between them. These model-based clustering analyses showed a typical pattern of unstructured populations. This point was confirmed by the fact that for $K=2$, the proportion of the sample assigned to each population was roughly symmetric ($1/K$ i.e 0.5 in each population) (Figure 3). For others K values (3-17), similar patterns were observed; meaning that the sample assigned to each population was nearly symmetric ($1/K$) (data not shown). All those points confirmed that it is not possible to differentiate the *T. aestivum uncinatum* samples in two sub-groups.

For the geographical correlation test, a correlation index R equal to 0.026 with a p -value > 0.05 (Supplementary Figure 3) was obtained. We cannot reject the null hypothesis indicating an absence of correlation between the two matrices, meaning that there is no significant correlation between the geographical and genetic matrices.

Discussion

The question addressed in this study, the possible conspecificity of *T. aestivum* and *T. uncinatum*, has been disputed for a long time. Although several studies have used molecular markers to answer this question, with sometimes contradictory conclusions, this is the first study to test this problem using a rigorous multilocus phylogenetic approach on a broad geographic sampling of morphotypes assigned to the two putative species.

Morphological characters for separation have proven to be unreliable as they show considerable variation in the *T. uncinatum/aestivum* group across sampling times and sampling sites. For diagnosing reproductive isolation as a criterion for two separate species, a single marker gene is considered insufficient, necessitating a multigene approach (Rokas et al. 2003). We used nine molecular marker genes that have been successfully used to distinguish other truffle species

(Jeandroz et al. 2008; Paolocci et al. 2004; Wang et al. 2006; Bonito et al. 2010a; Roux et al. 1999; Bonito et al. 2010b) or other fungi (Gardes and Bruns 1993; Hansen et al. 2005; Larsson and Jeppson 2008; Matheny 2005; Matheny et al. 2002; Spatafora et al. 2006; Stockinger et al. 2009).

Phylogenetic analyses yielded no support for a separation of *T. uncinatum* and *T. aestivum*, neither in single gene phylogenies nor based on the concatenated dataset. Indeed, even if some polymorphism was found, its level was far below that found when comparing *T. aestivum/uncinatum* with *T. macrosporum* or *T. magnatum*. A Partition Homogeneity Test for non-congruence of the phylogenies of the different gene loci, indicative of a recombining population and proposed as one indicator of conspecificity (Geiser et al. 1998) showed significant discordance between two genes.

Based on these analyses we conclude, in accordance with some previous studies, that *T. uncinatum* and *T. aestivum* are conspecific. The observed genetic differences do not explain and do not justify the existence of two different species, in agreement with morphological (Weden et al. 2005) analyses and aroma studies (Splivallo et al. 2012). The desire to separate these two taxa is more the expression of a cultural or regional attachment rather than based on scientific evidence.

Following the priority rules of botanical nomenclature, the name *T. aestivum* has priority because *T. aestivum* was described by Vittadini in 1831, long before *T. uncinatum* (Chatin 1887).

In the future it will be interesting to address the possible differentiation of *T. aestivum* to different environments across its wide range, using more sensitive molecular markers, such as microsatellites.

In France, local legislation regulates the harvesting periods. For example, legislation requires generally that *T. aestivum* must be harvested between June and September, whereas *T. uncinatum* is allowed to be collected and sold between September and January. Evidently, this will have to be adjusted to assure the harvest of truffles of high quality (i.e. optimal maturity) across different regions, taking into account specific local growing conditions.

Acknowledgments

This study was supported by the Burgundy Regional Council. We are grateful to Henri Frochot for providing *Tuber aestivum* samples. We thank Gian Carlo Ponzi and Claude Murat for providing *Tuber macrosporium* and *Tuber magnatum* samples, respectively. We are grateful to Gregory Bonito for providing primers sequences for the elongation factor 1 α gene. We also thank Régis Courtecuisse to accept our exsiccata samples in the LIP herbarium.

The authors declare that the experiments comply with the current laws of France.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2.
- Bonito, G., Trappe, J.M., Rawlinson, P., & Vilgalys, R. (2010a). Improved resolution of major clades within *Tuber* and taxonomy of species within the *Tuber gibbosum* complex. *Mycologia*, 102, 1042-1057. doi:10.3852/09-213.
- Bonito, G.M., Gryganskyi, A.P., Trappe, J.M., & Vilgalys, R. (2010b). A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology*, doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04855.x.
- Bonito, G.M., Smith, M., Nowak, M., Healy, R., Guevara, G., Cázares, E., Kinoshita, A., Nouhra, E., Domínguez, L., Tedersoo, L., Murat, C., Wang, Y., Moreno, B., Pfister, D., Nara, K., Zambonelli, A., Trappe, J., & Vilgalys, R. (2013). Historical biogeography and

- diversification of truffles in the *Tuberaceae* and their newly identified southern hemisphere sister lineage. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0052765.
- Chatin, A. (1887). Une nouvelle espèce de truffe. *Les comptes rendus de l'académie des sciences*, 104,1132-1135.
- Chevalier, G., Desmas, C., Frochot, H., & Rioussset, L. (1979). L'espèce *Tuber aestivum* Vitt. : I. Définition. *Mushroom Science X*, (Part 1), 957-975.
- Chevalier, G., & Frochot, H. (1997). *La truffe de Bourgogne*. Levallois-Perret, France : Éditions Pétrarque.
- Cunningham, C.W. (1997). Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution*, 14, 733-740.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology*, doi:e8810.1371/journal.pbio.0040088.
- Drummond, A.J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, doi:21410.1186/1471-2148-7-214.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, doi:10.1093/molbev/mss075
- Du Mortier, B.C. (1822). *Commentationes botanicae: Observations botaniques, dédiées à la Société d'horticulture de Tournay*.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.

- Gandeboeuf, D., Dupré, C., & Chevalier, G. (1994). Use of isoenzyme analysis to differentiate truffles from Europe. *Acta Botanica Gallica*, 141, 455–463.
- Gardes, M., & Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113-118
- Geiser, D.M., Pitt, J.I., & Taylor, J.W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 388-393.
- Glass, N.L., & Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.
- Guillemaud, T., Raymond, M., Callot, G., Cleyet-Marel, J.C., & Fernandez, D. (1996). Variability of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA of a truffle species (*Tuber aestivum*). *Mycological Research*, 100, 547-550.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, doi:10.1093/sysbio/syq010.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hansen, K., LoBuglio, K.F., & Pfister, D.H. (2005). Evolutionary relationships of the cup-fungus genus *Peziza* and *Pezizaceae* inferred from multiple nuclear genes: RPB2, beta-

- tubulin, and LSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, doi:10.1016/j.ympev.2005.03.010
- Huelsenbeck, J.P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- Jeandroz, S., Murat, C., Wang, Y.J., Bonfante, P., & Le Tacon, F. (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the 'true truffles'. *Journal of Biogeography*, doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01851.x.
- Larsson, E., & Jeppson, M. (2008). Phylogenetic relationships among species and genera of Lycoperdaceae based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycological Research*, doi:10.1016/i.mycres.2007.10.018.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, doi:10.1093/bioinformatics/btp187.
- Maddison, W.P., & Knowles, L.L. (2006). Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, doi:10.1080/10635150500354928.
- Maddison, W.P., & Maddison, D. (2011). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.
- Matheny, P.B. (2005). Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, doi:10.1016/j.ympev.2004.11.014.
- Matheny, P.B., Liu, Y.J.J., Ammirati, J.F., & Hall, B.D. (2002) Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal of Botany*, 89, 688-698.

- Mello, A., Cantisani, A., Vizzini, A., & Bonfante, P. (2002). Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environmental Microbiology*, 4, 584-594.
- Molitor, C., Inthavong, B., Sage, L., Geremia, R.A., & Mouhamadou, B. (2010). Potentiality of the *cox1* gene in the taxonomic resolution of soil fungi. *FEMS Microbiology Letters*, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01839.x.
- Mouches, C., Duthil, P., Poitou, N., Delmas, J., & Bove, J. (1981). Caractérisation des espèces truffières par analyse de leurs protéines en gels de polyacrylamide et application de ces techniques à la taxonomie des champignons. *Mushroom Science*, 11, 819–831.
- Paolocci, F., Rubini, A., Riccioni, C., Topini, F., & Arcioni, S. (2004). *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? *FEMS Microbiology Letters*, 235, 109-115.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* doi:10.1093/molbev/msn083.
- Posada, D., & Buckley, T.R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, doi:10.1080/10635150490522304.
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rambaut, A., & Drummond, A.J (2006) TreeAnnotator 1.4.5. <http://beastbioedacuk/TreeAnnotator>.
- Rambaut, A., & Drummond, A.J. (2007). Tracer v1.4. Available from <http://beastbioedacuk/Tracer>.

- RiOUSset, L., RiOUSset, G., Chevalier ,G., & Bardet, M.C. (2001). Truffles d'Europe et de Chine. INRA Editions, Paris, France.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N., Carroll, S.B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, doi:10.1038/nature02053.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* doi:10.1093/bioinformatics/btg180.
- Roux, C., Sejalón-Delmas, N., Martins, M., Parguey-Leduc, A., Dargent, R., & Becard, G. (1999). Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 180, 147-155.
- Spatafora, J.W., Sung, G.H., Johnson, D., Hesse, C., O'Rourke, B., Serdani, M., Spotts, R., Lutzoni, F., Hofstetter, V., Miadlikowska, J., Reeb, V., Gueidan, C., Fraker, E., Lumbsch, T., Lücking, R., Schmitt, I., Hosaka, K., Aptroot, A., Roux, C., Miller, A.N., Geiser, D.M., Hafellner, J., Hestmark ,G., Arnold, A.E., Budel, B., Rauhut, A., Hewitt, D., Untereiner, W.A., Cole, M.S., Scheidegger, C., Schultz, M., Sipman, H., & Schoch, C.L. (2006). A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia*, 98,1018-1028.
- Splivallo, R., Valdez, N., Kirchhoff, N., Ona, M.C., Schmidt, J.P., Feussner, I., & Karlovsky, P. (2012). Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytologist* doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04077.x.
- Stockinger, H., Walker, C., & Schussler, A. (2009) ,'*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x.

- Swofford, D.L. (2002). PAUP* : Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, doi:10.1093/molbev/msr121.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., & Fisher, M.C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, doi:10.1006/fgbi.2000.1228.
- Templeton, A.R. (1983). Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution*, doi:10.2307/2408332.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. (1994). Clustal-w - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/22.22.4673.
- Urbanelli, S., Sallicandro, P., De Vito, E., Bullini, L., & Biocca, E. (1998). Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. *Mycologia*, 90, 537-546.
- van Tuinen, D., Zhao, B., & Gianinazzi-Pearson, V. (1998). PCR in studies of AM fungi : From primers to application. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Vittadini, C. (1831). Monographia tuberacearum. Rusconi, Milan
- Wang, Y.J., Tan, Z.M., Zhang, D.C., Murat, C., Jeandroz, S., & Le Tacon, F. (2006). Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle, and other

Tuber species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, doi:10.1111/j.1574-6868.2006.00283.x.

Weden, C., Danell, E., & Tibell, L. (2005). Species recognition in the truffle genus *Tuber* - the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00837.x.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* Academic Press, San Diego, CA.

Tables

Table 1: Identity of samples, type indication and geographic location.

ID	Type	Country	Location [§]	Collector	Harvesting date	Donor
CH2	<i>T. uncinatum</i>	France-Charente	Jarnac	G. Chevalier	2010	G. Chevalier
CH4	<i>T. uncinatum</i>	France-Charente	Jarnac	G. Chevalier	2010	G. Chevalier
D4	<i>T. uncinatum</i>	France-Côte d'Or	Daix	V. Molinier & H. Frochot	November 2010	V. Molinier & H. Frochot
D5	<i>T. uncinatum</i>	France-Côte d'Or	Daix	V. Molinier & H. Frochot	November 2010	V. Molinier & H. Frochot
E38	<i>T. uncinatum</i>	Hungary	Debrecen	Unknown	unknown	G. Chevalier
E43	<i>T. uncinatum</i>	Luxembourg	Rumelange	Unknown	17th November 2002	G. Chevalier
E58	<i>T. uncinatum</i>	Switzerland	Lausanne	M. Groux	20th November 2000	G. Chevalier
E60	<i>T. uncinatum</i>	Turkey	Ankara	Unknown	1st July 1997	G. Chevalier
E70	<i>T. uncinatum</i>	United Kingdom	Bedford	Unknown	October 2004	G. Chevalier
E98	<i>T. uncinatum</i>	Romania	Bucarest	Unknown	November 2006	G. Chevalier
E101	<i>T. uncinatum</i>	Slovakia	Bratislava	Unknown	November 2003	G. Chevalier
E104	<i>T. uncinatum</i>	Sweden	Roma	C. Weden	November 2006	G. Chevalier
E122	<i>T. aestivum</i>	Spain	Granada	R. Ribes	January 2008	G. Chevalier
F1	<i>T. aestivum</i>	France-Corse	Santa-Lucia-di-Moriani	Unknown	June 2002	G. Chevalier
F4	<i>T. aestivum</i>	France-Alpes Maritimes	Menton	G. Chevalier	March 2003	G. Chevalier
F16	<i>T. aestivum</i>	France-Dordogne	Saint-Pantaly-d'Excideuil	M. Aynaud	unknown	G. Chevalier
F23B	<i>T. aestivum</i>	France-Drôme	Montjoyer	P. Tabouret	unknown	G. Chevalier
F25	<i>T. aestivum</i>	France-Hérault	Colombiers	M. Brayes	June 1992	G. Chevalier
F31	<i>T. aestivum</i>	France-Lot	Gignac	J. Delsol	June 1996	G. Chevalier
F65	<i>T. uncinatum</i>	France-Savoie	Gaillard	Unknown	3rd November 2000	G. Chevalier
F74	<i>T. aestivum</i>	France-Vaucluse	Richerenches	Unknown	1st July 1987	G. Chevalier
F85	<i>T. uncinatum</i>	France-Yonne	Dyé	M. Jalade	23th August 2001	G. Chevalier
F95	<i>T. aestivum</i>	France-Gironde	Bordeaux	M. Castroviejo	April 2004	G. Chevalier
F103	<i>T. aestivum</i>	France-Bouches du Rhône	Saint-Rémy-de-Provence	L. Rioussel	unknown	G. Chevalier
F166	<i>T. uncinatum</i>	France-Aube	Vailly	M. Poinot	October 2006	G. Chevalier
F171	<i>T. aestivum</i>	France-Aude	Quillan	Unknown	March 2001	G. Chevalier
MAC*	<i>T. macrosporum</i>	Italy	NA	Gian Carlo Ponzi	2010	G.C Ponzi
MAG*	<i>T. magnatum</i>	Italy	NA	Unknown	unknown	C. Murat

[§] Due to the confidentiality between authors and truffle providers, only names of the closest town or village are indicated

NA = Not available

Table 2: Target loci, primer sequences and special PCR conditions used during this study.

Locus	Primers & Sequences (5'-3') ^a	References	BSA, DMSO & MgCl ₂ concentrations	PCR conditions
β-tubulin	Bt2a : GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	(Glass and Donaldson 1995)	MgCl ₂ 1.5 mM	95°C : 3 min
	Bt2b : ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	(Glass and Donaldson 1995)		35 × (94°C : 30 s, 59°C : 45 s, 72°C : 1 min)
	Btspect : GTCGGGGAACCTCTCACGGATCTTRGAG	(Paolocci et al. 2004)		72°C : 10 min
EF1α	EF1aTub_for2	(Bonito et al. 2013)	BSA : 0.9 µg / µl	94°C : 1 min 30 s
	EF1aTub_rev1	(Bonito et al. 2013)		24 × (94°C : 30 s, 55°C : 30 s (-0.4°C each cycle), 72°C : 1 min 30 s (+0.02 min each cycle))
				12 × (94°C : 30 s, 45°C : 30 s, 72°C : 2 min) 72°C : 10 min
ITS1	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White et al. 1990)	MgCl ₂ 1.5 mM	94°C : 3 min
	ITS2 : GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(White et al. 1990)	DMSO : 10 %	35 × (94°C : 1 min, 56°C : 1 min, 72°C : 1 min) 72°C : 10 min
ITS2	ITS3: GCATCGATGAAGAACGCAGC	(White et al. 1990)	MgCl ₂ 1.5 mM	94°C : 3 min
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White et al. 1990)	DMSO : 10 %	35 × (94°C : 1 min, 56°C : 1 min, 72°C : 1 min) 72°C : 10 min
mt LSU	ML3: GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAA	(White et al. 1990)	Nothing added	94°C : 3 min
	ML4: GAGGATAATTGCGGAGTTCC	(White et al. 1990)		35 × (94°C : 45 s, 50°C : 45 s, 72°C : 1 min) 72°C : 10 min
mt SSU	MT1: TACGTGCCAAGCAGTCGCGGTAATACG	(Guillemaud et al. 1996)	Nothing added	94°C : 3 min
	MT2: TACTCTTGAGGTGGAATGCTTACAC	(Guillemaud et al. 1996)		40 × (94°C : 45 s, 55°C : 45 s, 72°C : 1 min) 72°C : 10 min
nu LSU	LR1 : GCATATCAATAAGCGGAGGA	(van Tuinen et al. 1998)	Nothing added	94°C : 3 min
	NDL22 : TGGTCCGTGTTCAAGACG	(van Tuinen et al. 1998)		35 × (94°C : 30 s, 58°C : 30 s, 72°C : 1 min) 72°C : 10 min
nu SSU	SSU1 : CAGAGGTGAAATTCTTGGAT	(Molitor et al. 2010)	Nothing added	94°C : 3 min,
	SSU2 : TGTGTACAAAGGCAGGG	(Molitor et al. 2010)		35 × (94°C : 45 s, 50°C : 45 s, 72°C : 2 min) 72°C : 10 min.
RPB2 7_11	RPB2V_7_11_F1: GGCAAATATTCTTTACTACC	In this study	Nothing added	94°C : 3 min
	RPB2V_7_11_R1: CTCCTTCAAACCTCGTAATG	In this study		15 × (94°C : 45 s, 55°C : 45 s, 72°C : 1 min) 20 × (94°C : 45 s, 50°C : 45 s, 72°C : 1 min) 72°C : 10 min

^a IUPCA degenerate nucleotides: M, AC; R, AG; W, AT; Y, CT.

Table 3: Genetic diversity indices within the *Tuber aestivum* / *uncinatum* group (3.a) ; divergence between *Tuber aestivum*/ *uncinatum* groups and *Tuber macrosporum* (MAC) and *Tuber magnatum* (MAG) (3.b) and Fst values calculated between pre-assigned *Tuber aestivum* and pre-assigned *uncinatum* groups (3c) for each target locus separately and the supermatrix (concatenated genes).

	3a						3b			3c
Target gene	G+C content (%)	Polymorphic sites (v)	Singleton variable sites (s)	Haplotypes (nH)	Haplotype diversity (H)	Nucleotide diversity (π) (per site)	Nucleotide divergence to MAC (%)	Nucleotide divergence to MAG (%)	Nucleotide Divergence between MAG and MAC (%)	Fst values between “aestivum group” and “uncinatum group”
nuLSU	54.3	11 (2.11%)	10	8	0.674	0.00228 (\pm 0.00055)	0.07916	0.12573	0.11569	0
nuSSU	50.5	7 (1.08%)	4	6	0.652	0.00184 (\pm 0.00045)	0.00572	0.00572	0.0062	0.06015
mtLSU	32.6	3 (0.38%)	2	4	0.345	0.00047 (\pm 0.00017)	0.01324	0.03057	0.02372	0.03571
mtSSU	34.8	1 (0.35%)	1	2	0.077	0.00027 (\pm 0.00024)	0.01066	0.00716	0.00703	0
ITS1	67.5	17 (6.75%)	7	17	0.951	0.02068 (\pm 0.00169)	0.49122	0.6014	0.68067	0.11299
ITS2	61.8	17 (4.79%)	8	9	0.748	0.00844 (\pm 0.00184)	0.39121	0.36989	0.35543	0.06139
β -tubulin	48.1	4 (0.75%)	2	5	0.622	0.00156 (\pm 0.00029)	-	0.09708	-	0.05473
EF 1- α	46.5	34 (3.58%)	23	20	0.978	0.00756 (\pm 0.00146)	0.12262	0.07762	0.12124	0.01214
RPB2 7-11	47.3	9 (1.36%)	7	4	0.545	0.00219 (\pm 0.00067)	0.1064	0.04662	0.09131	0.06825
Super Matrix	47.4	103 (2.18%)	64	26	1	0.00383 (\pm 0.00032)	0.09683	0.09289	0.10578	0.05902

Figure Legends

Figure 1: Phylogenetic relationships among the 26 *Tuber aestivum-uncinatum* isolates inferred using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) from the concatenated 9-gene data set (4722 bp total). Same topology was obtained for both phylogenetic analyses after 1000 bootstrap replicates for ML and 2000000 generations for BI using GTR+G model for both analyses. The tree is rooted with *T. macrosporum* and *T. magnatum* (in italics). Only bootstrap values higher than 70% (number above) and posterior probabilities higher than 0.95 (number below) are indicated. The two pre-assigned type “*T. aestivum*” and “*T. uncinatum*” are indicated by “A” (boldface) and “U” respectively. The geographic origin is indicated after for each sample ID.

Figure 2: Coalescent tree reconstruction for all concatenated genes. Only posterior probabilities higher than 0.95 are indicated. The tree is rooted with MAC (*T. macrosporum*) and MAG (*T. magnatum*)

Figure 3: Structure analysis

Summary plot of estimates of Q (membership) in the two defined clusters for the European data set with the 9 markers in the 26 individuals with K=2. Each individual is represented by a single line broken into K grey-colored segments, with lengths proportional to each of the K inferred clusters .

Figure 1

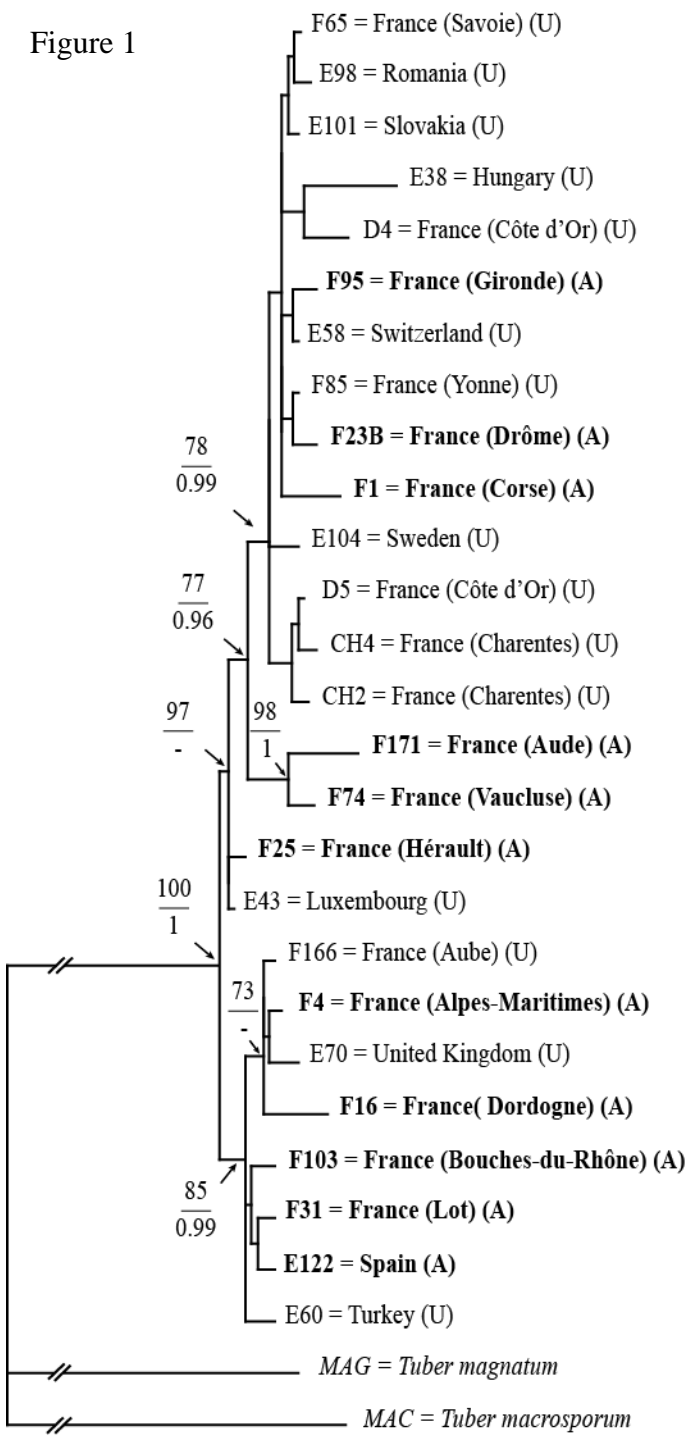


Figure 2

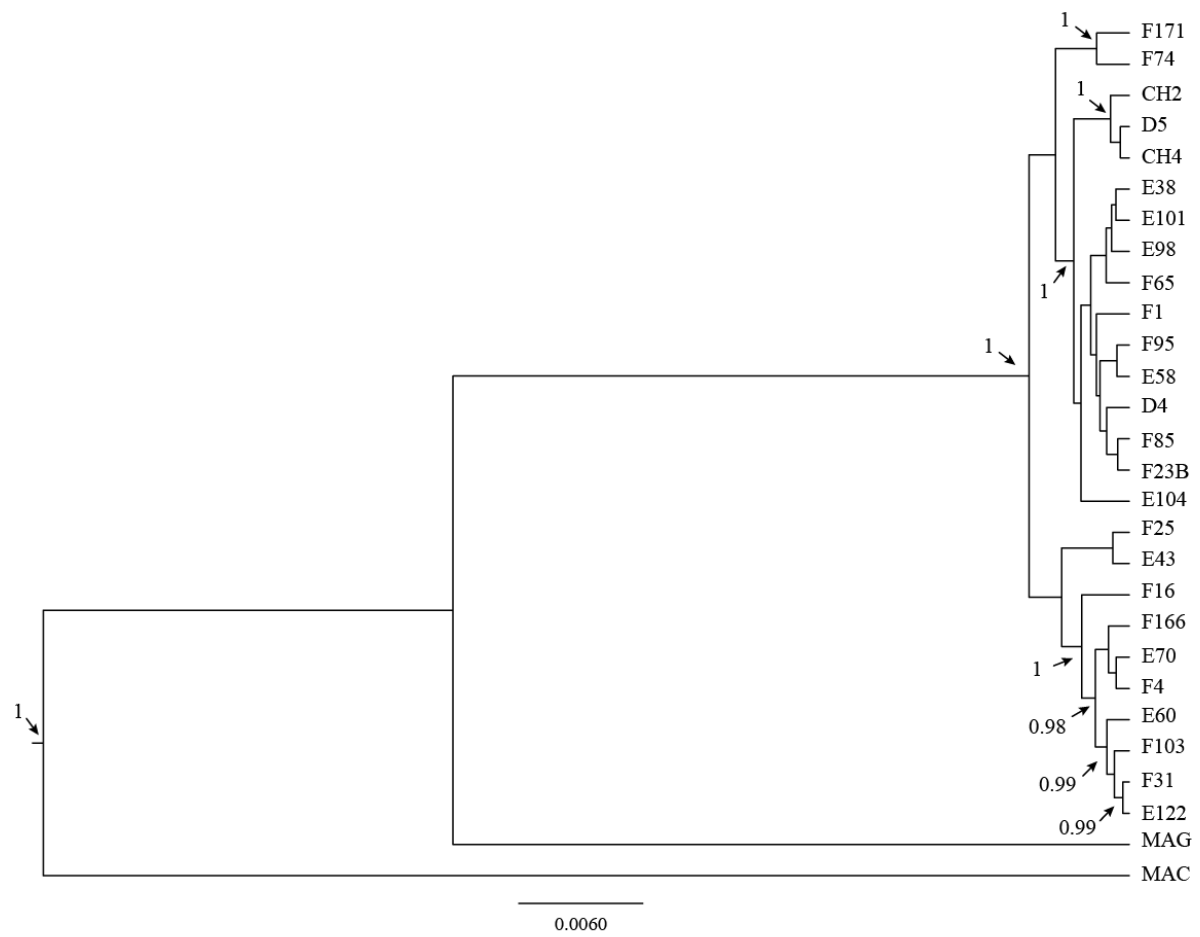
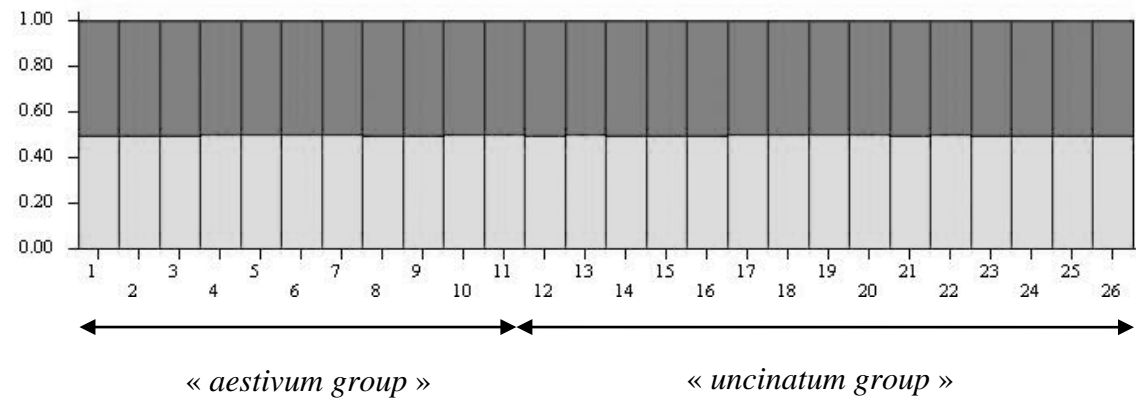


Figure 3



Supplementary Data 1: Detailed information on the implementation of all phylogenetic methods; Maximum likelihood (1.a) and Bayesian inference (1.b)

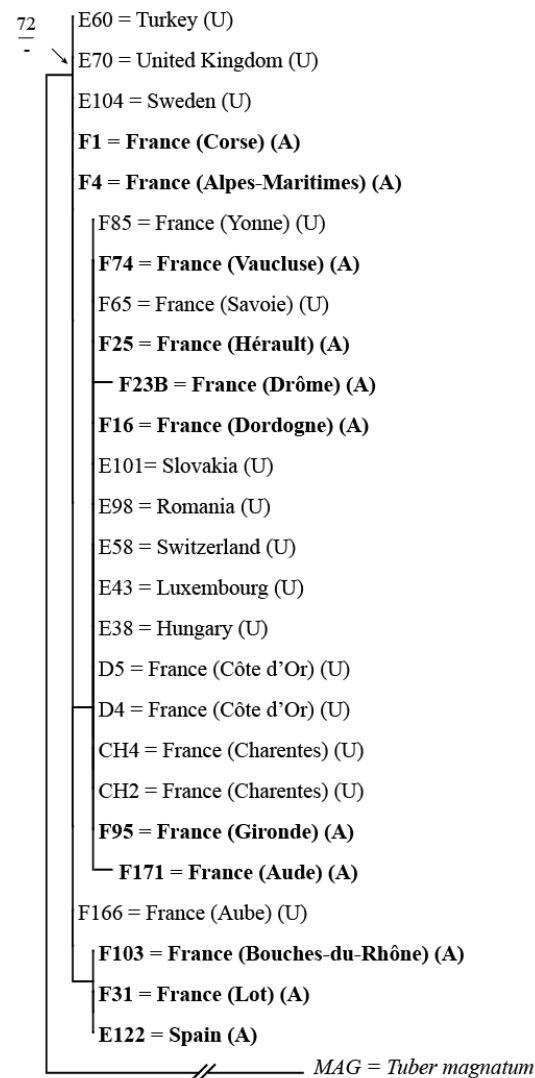
Maximum likelihood

Locus	Substitution model	negative log likelihood - lnL	Akaike Information Criterion AIC	Number of bootstrap
β -tubulin	HKY + G	959.4455	2032.8911	1000
EF1 α	HKY + G	1707.8306	3533.6613	1000
ITS1	HKY + G	1021.188	2160.3767	1000
ITS2	HKY + G	1153.4642	3434.9284	1000
mt LSU	GTR + G	1271.1085	2668.217	1000
mt SSU	F81	414.8745	943.7491	1000
nu LSU	GTR + G	1160.3594	2446.7187	1000
nu SSU	K80 + G	1000.905	2113.81	1000
RPB2 7_11	GTR	1321.1854	2766.3709	1000
Super Matrix	GTR + G	10884.0899	21894.1799	1000

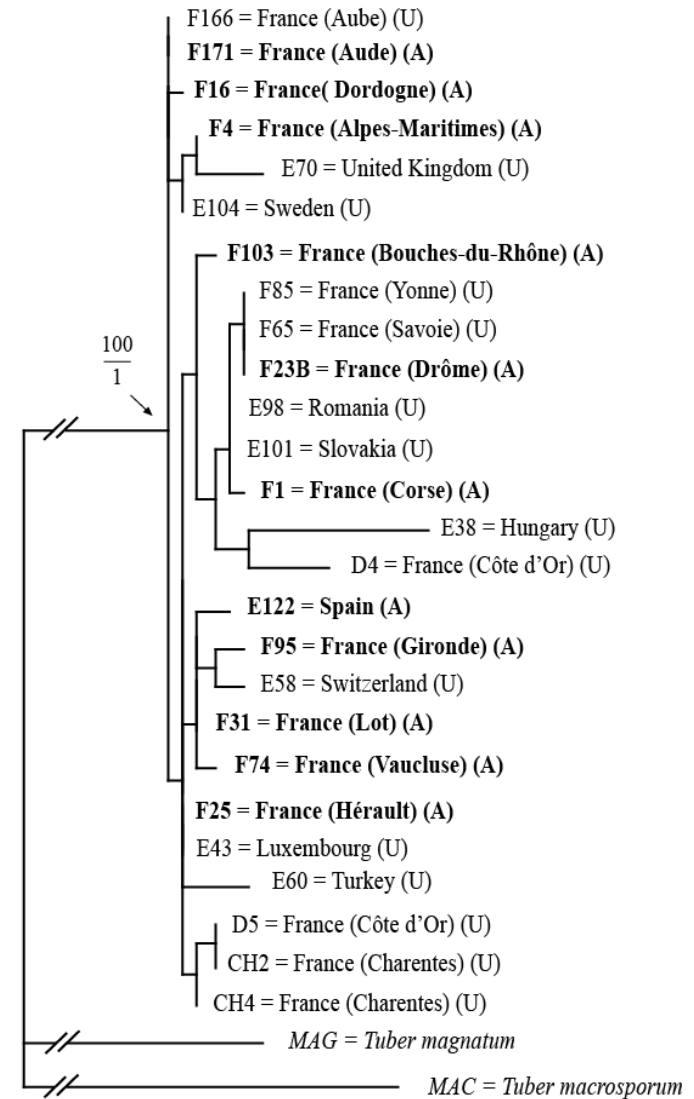
Bayesian inference

Locus	Substitution model	mcmc generations	samplefreq	Average standard deviation of split frequencies	sump	sumt
β -tubulin	HKY + G	10000000	1000	0.0066114	2500	2500
EF1 α	HKY + G	30000000	1000	0.008392	750	750
ITS1	HKY + G	1000000	1000	0.008643	250	250
ITS2	HKY + G	1000000	1000	0.008286	250	250
mt LSU	GTR + G	1000000	1000	0.009510	250	250
mt SSU	F81	10000000	1000	0.003299	2500	2500
nu LSU	GTR + G	1900000	1000	0.009731	475	475
nu SSU	K80 + G	1100000	1000	0.009131	275	275
RPB2 7_11	GTR	2000000	1000	0.005810	500	500
Super Matrix	GTR + G	2000000	1000	0.009159	500	500

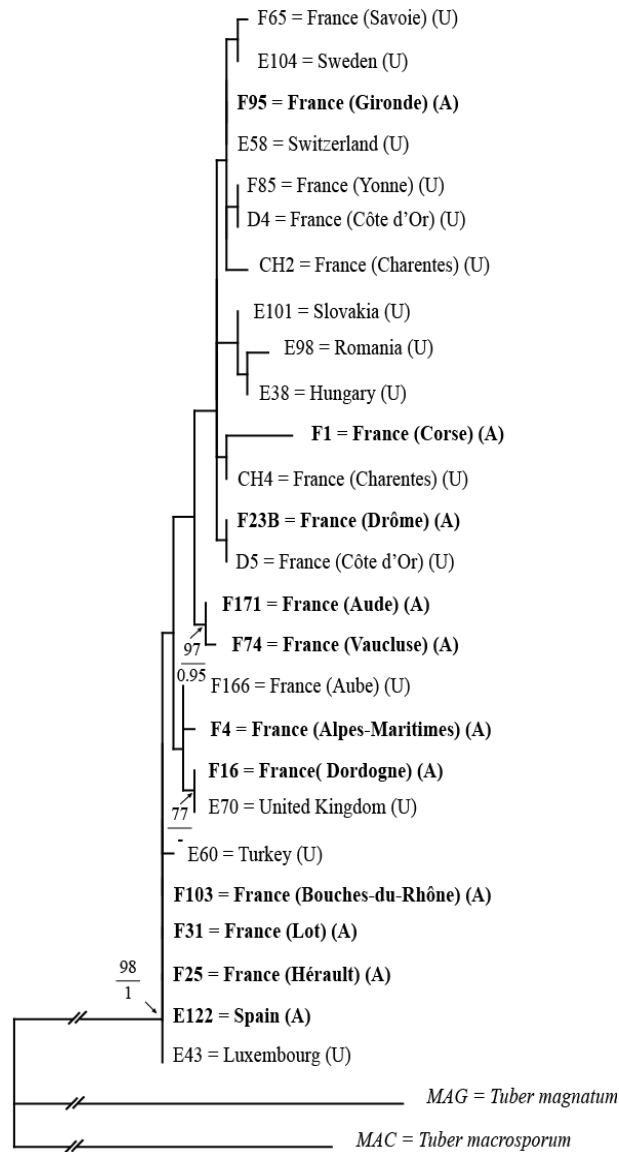
Supplementary Figures 1: Phylogenetic relationships among the 26 *Tuber aestivum*-*uncinatum* isolates inferred using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) from each gene (ML is shown); Beta-tubulin gene (1.a), EF1 α gene (1.b), ITS1 (1.c), ITS2 (1.d), mt LSU (1.e), mtSSU (1.f), nu LSU (1.g), nu SSU (1.h), RPB2 7_11 (1.i). Trees are rooted with *Tuber macrosporum* and *Tuber magnatum* (in italics). Only bootstrap values higher than 70% (number above) and posterior probabilities higher than 0.95 (number below) are indicated. The two pre-assigned types “*Tuber aestivum*” and “*Tuber uncinatum*” are indicated by “A” (boldface) and “U” respectively. The geographic origin is indicated after for each sample ID.



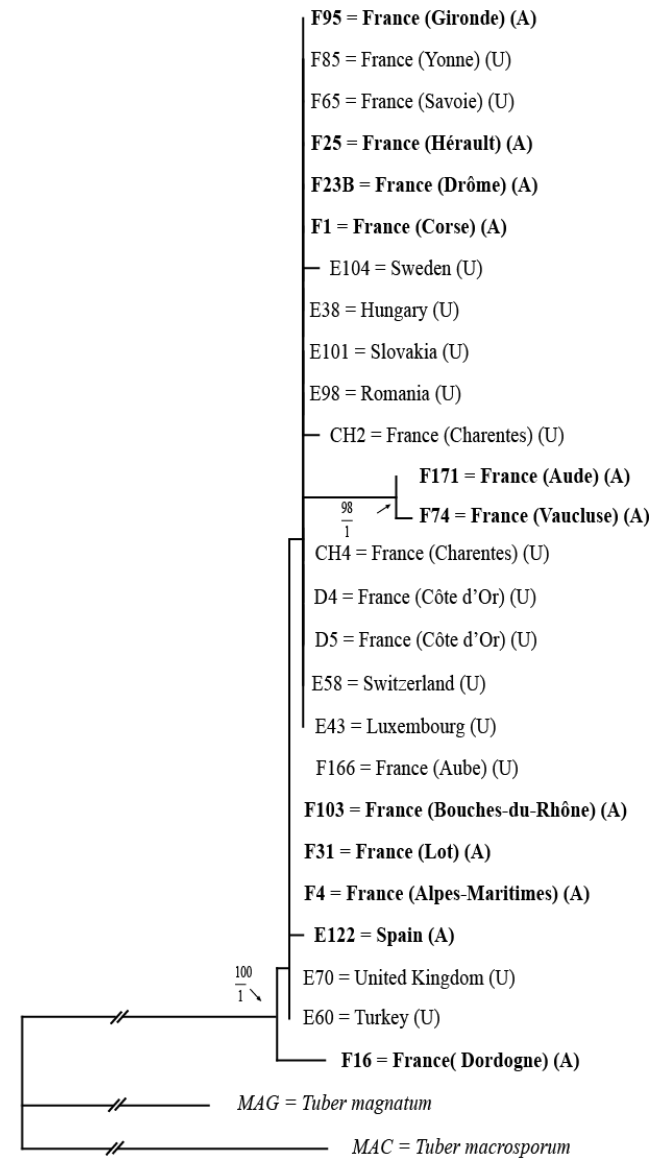
Supplementary Fig 1.a (BT gene)



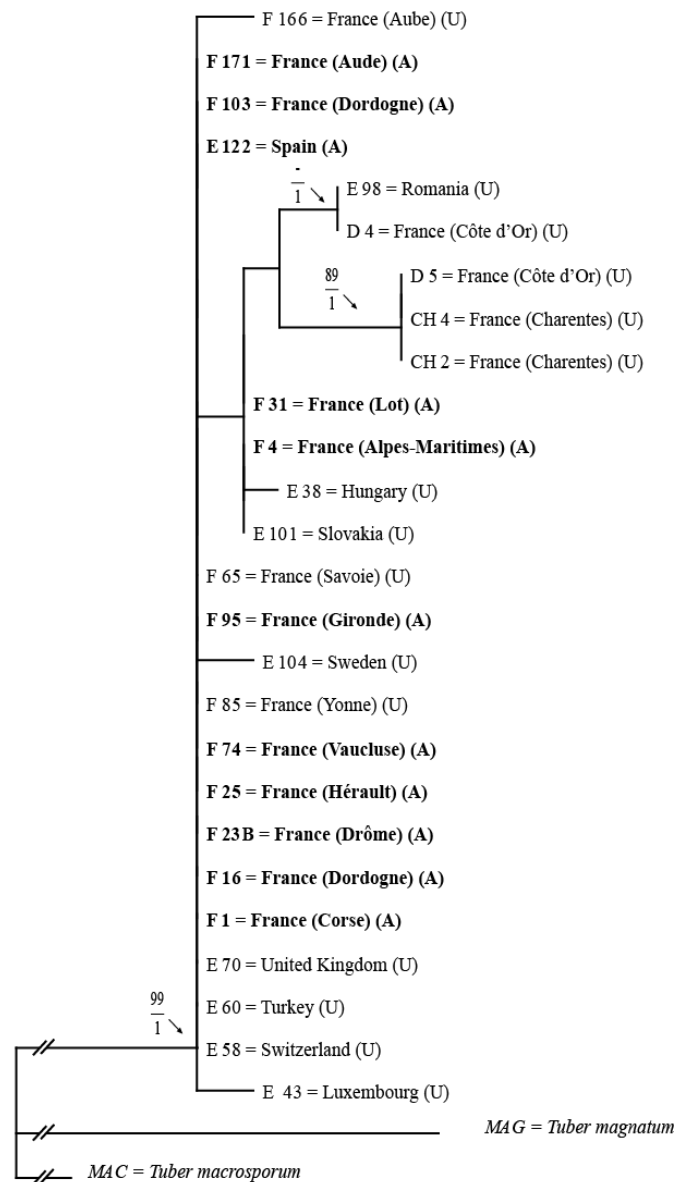
Supplementary Fig 1.b (EF1α gene)



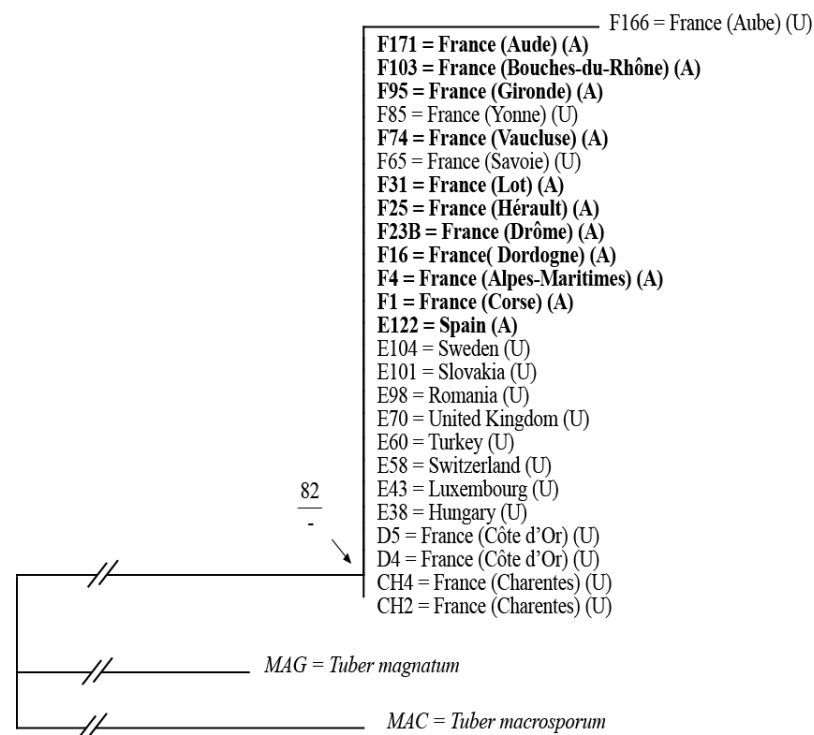
Supplementary Fig 1.c (ITS1)



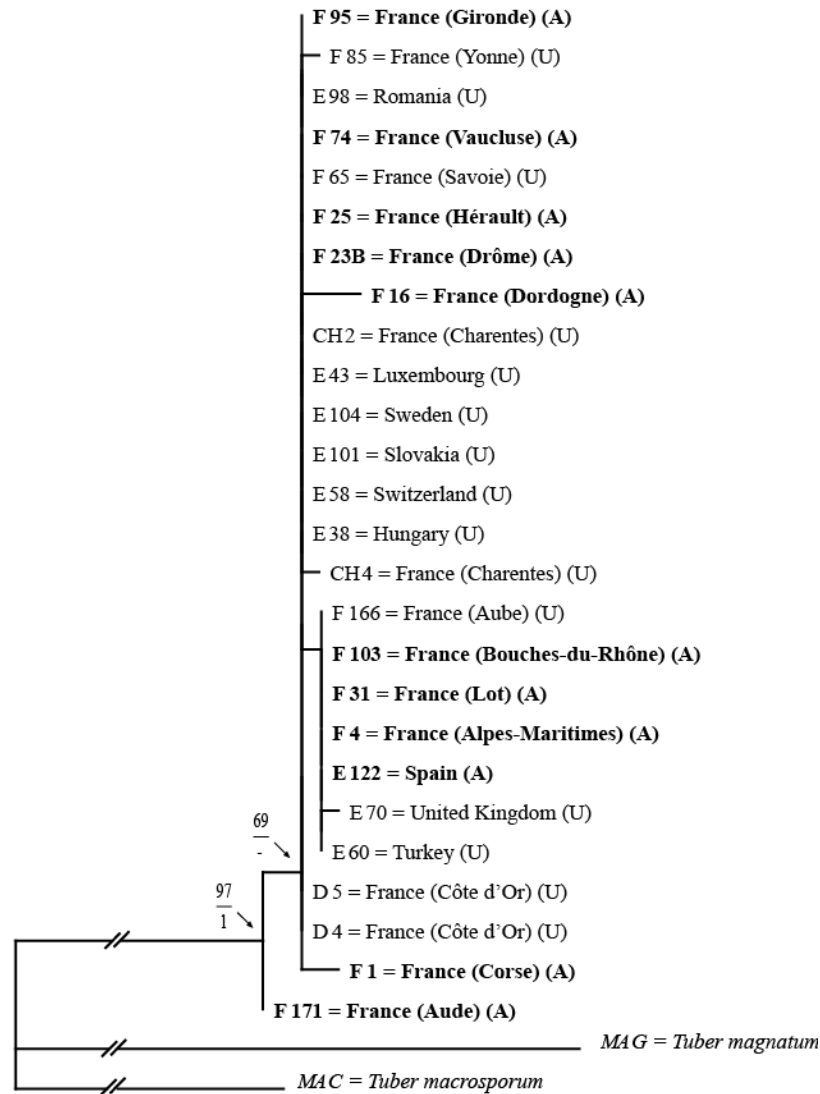
Supplementary Fig 1.d (ITS2)



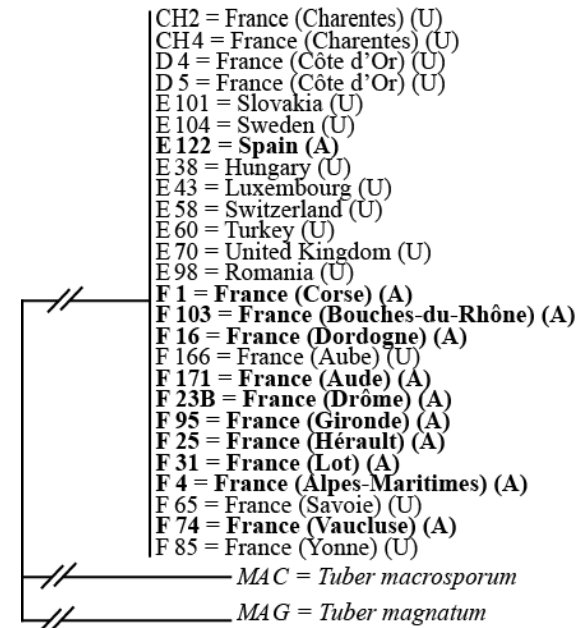
Supplementary Fig 1.e (mt LSU)



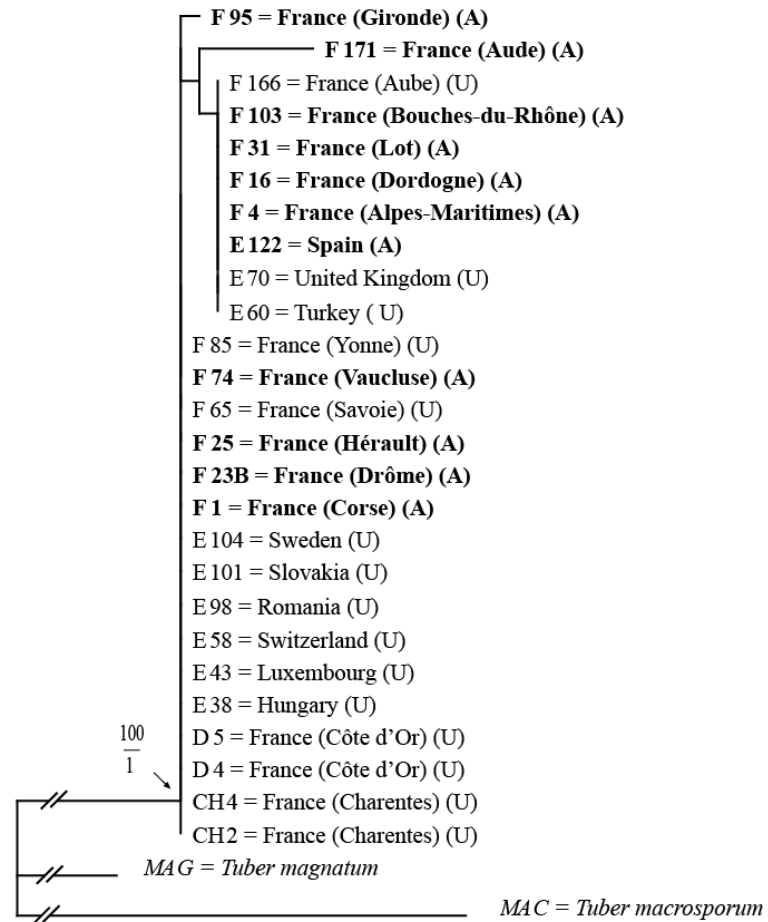
Supplementary Fig 1.f (mt SSU)



Supplementary Fig 1.g (nu LSU)

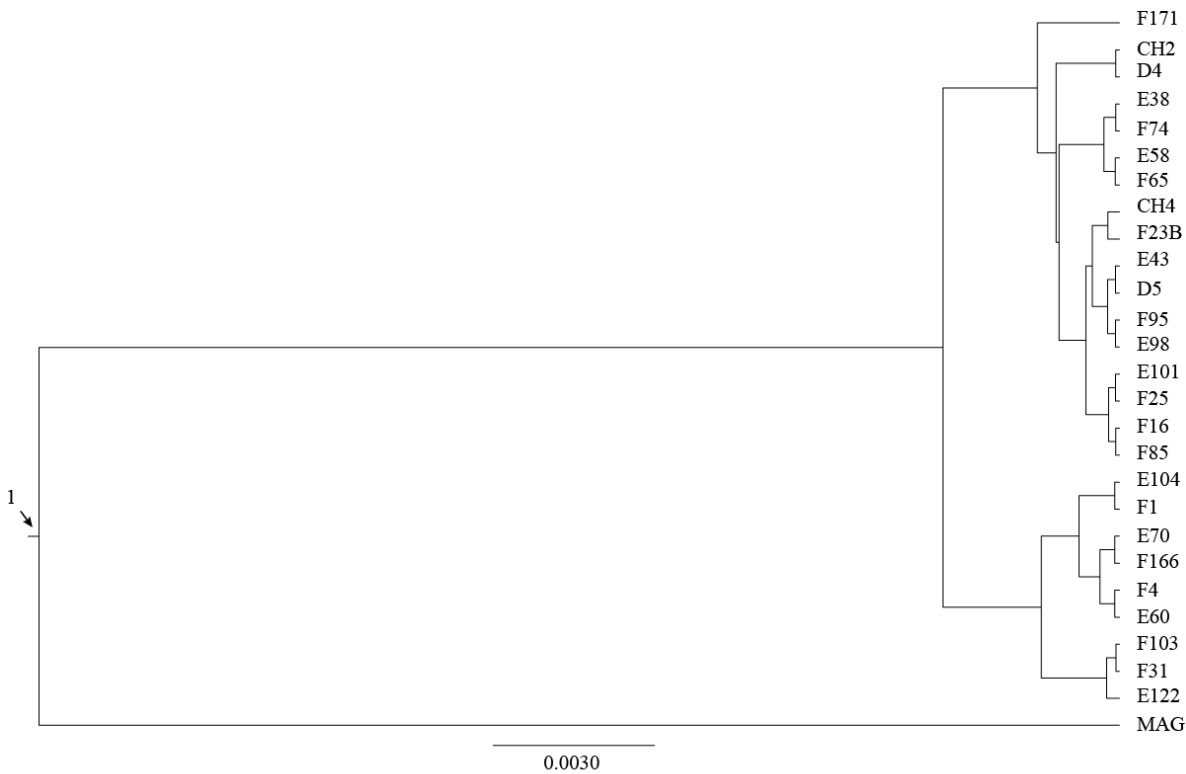


Supplementary Fig 1.h (nu SSU)

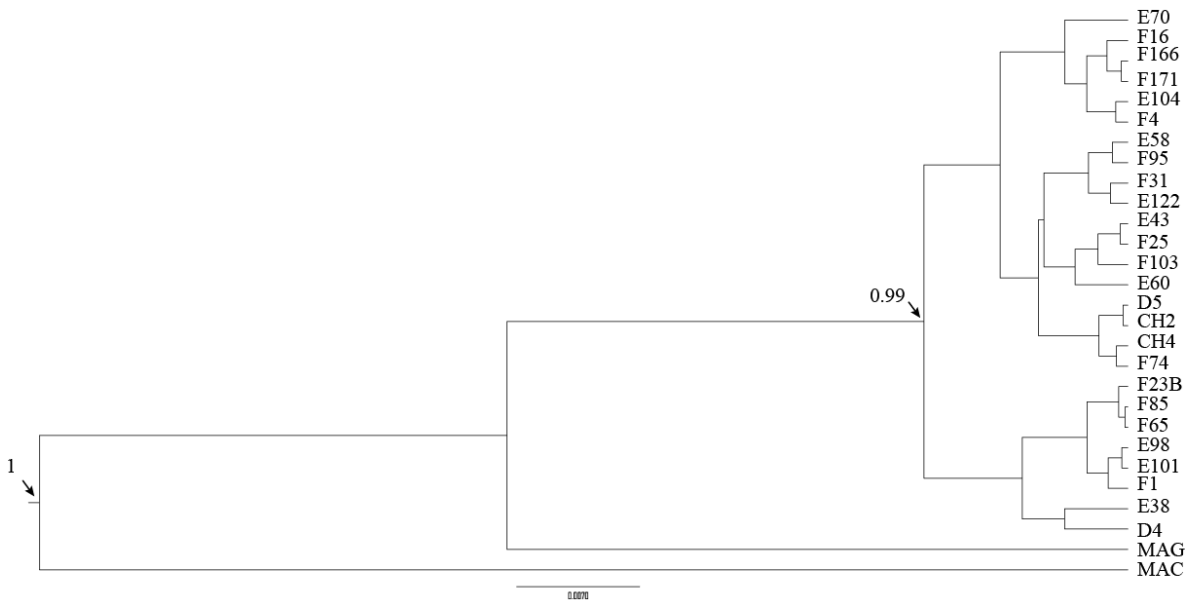


Supplementary Fig 1.i (RPB2 7_11)

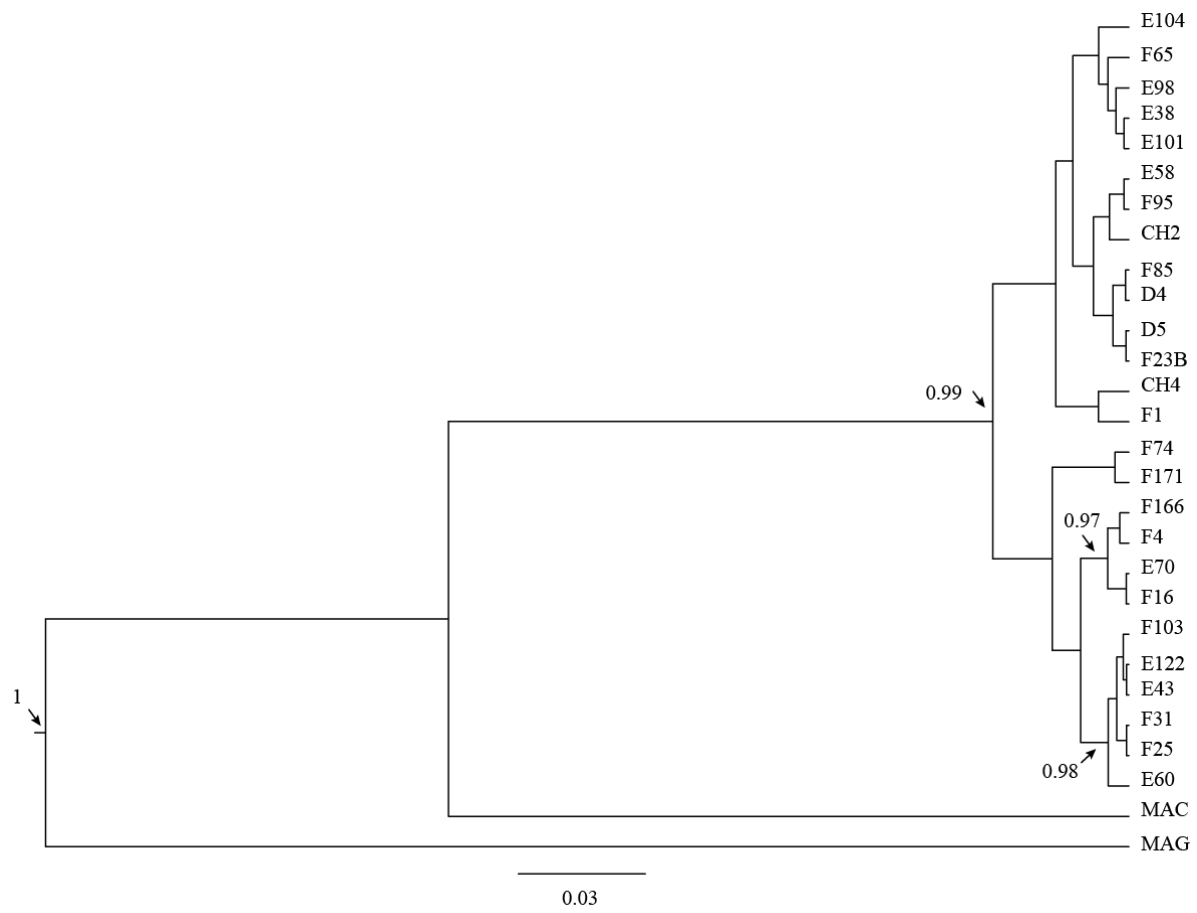
Supplementary Figures 2: Coalescent trees reconstruction for beta-tubulin gene (2.a), EF1 α gene (2.b), ITS1 (1.c), ITS2 (2.d), mt LSU (2.e), mtSSU (2.f), nu LSU (2.g), nu SSU (2.h), RPB2 7_11 (2.i). Only posterior probabilities higher than 0.95 are indicated. Trees are rooted with MAC (*Tuber macrosporum*) and MAG (*Tuber magnatum*)



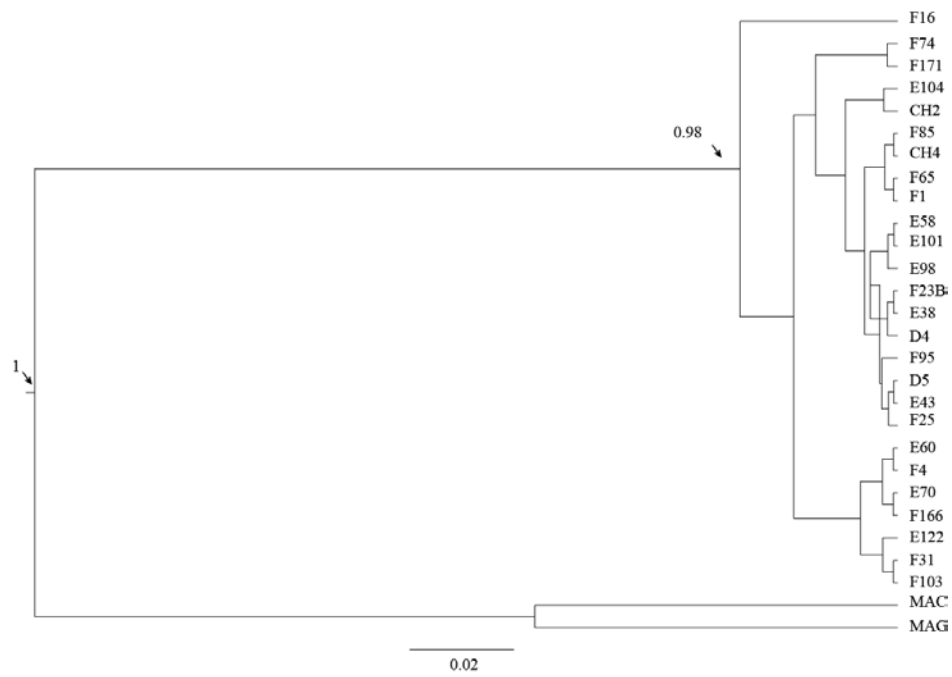
Supplementary Fig 2.a (BT gene)



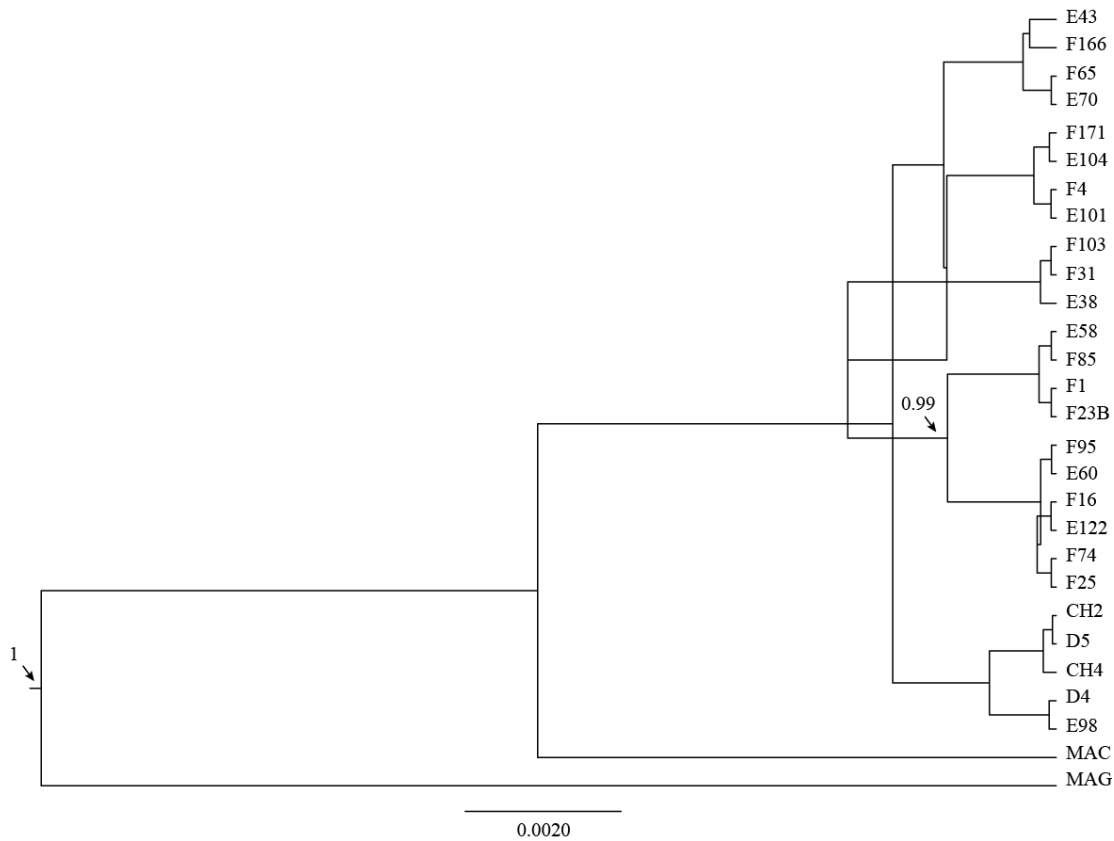
Supplementary Fig 2.b (EF1 α gene)



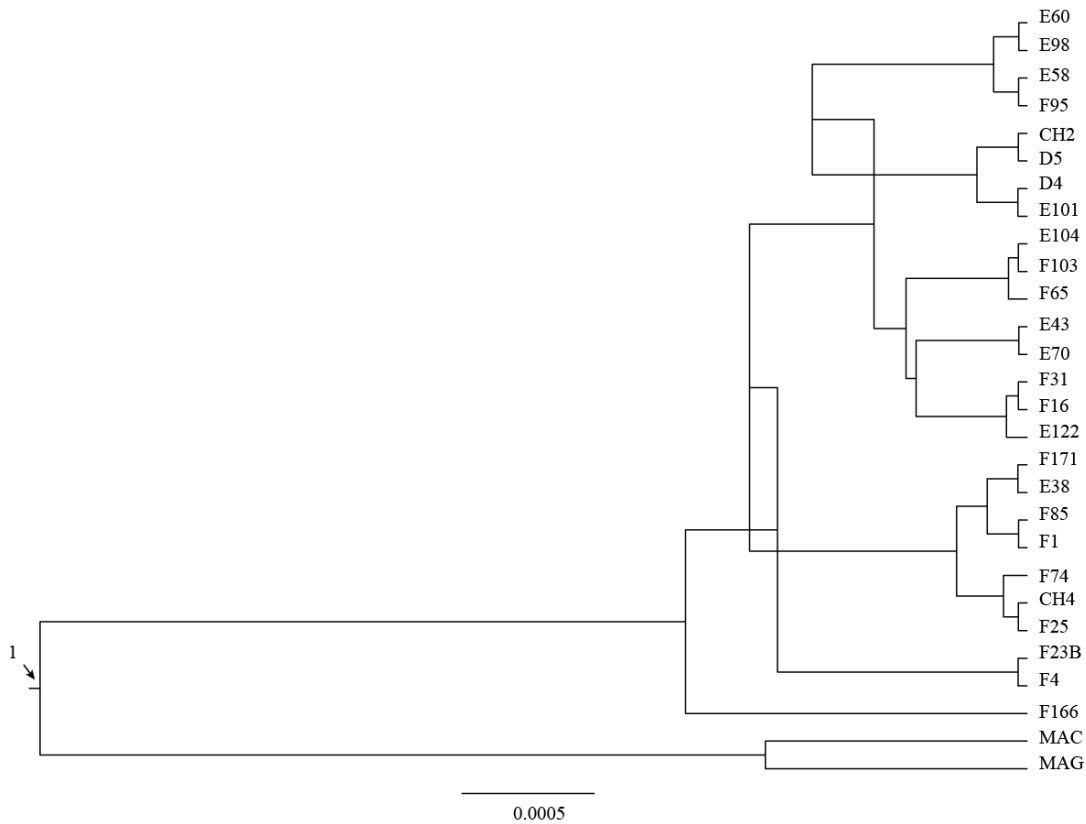
Supplementary Fig 2.c (ITS1)



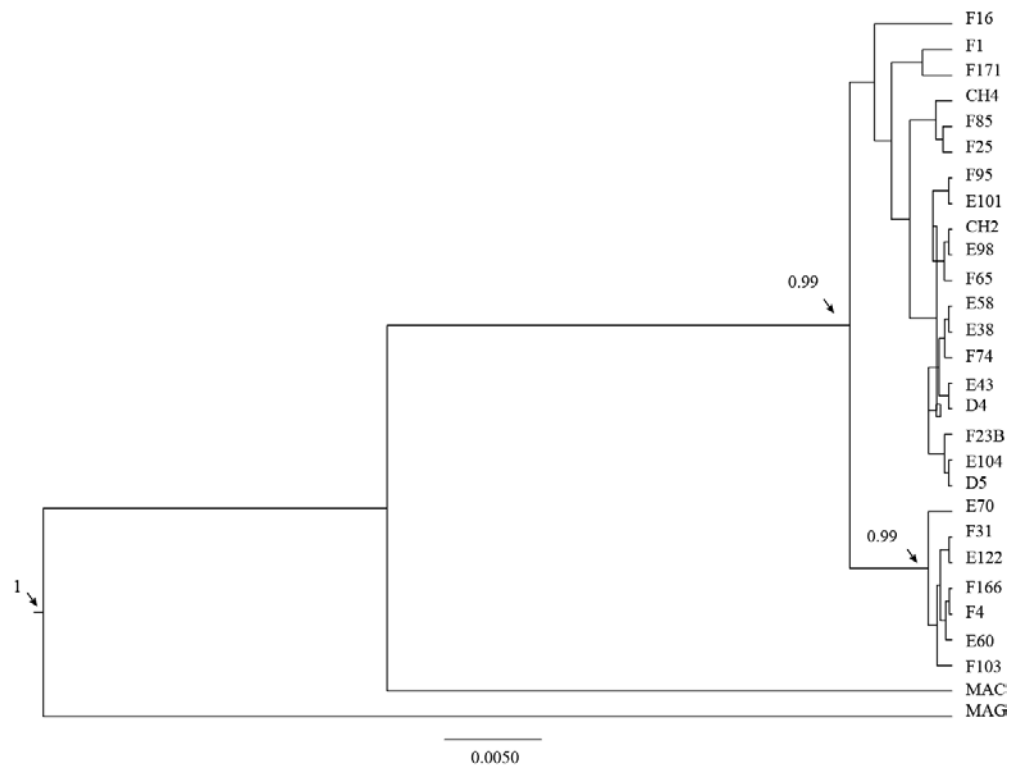
Supplementary Fig 2.d (ITS2)



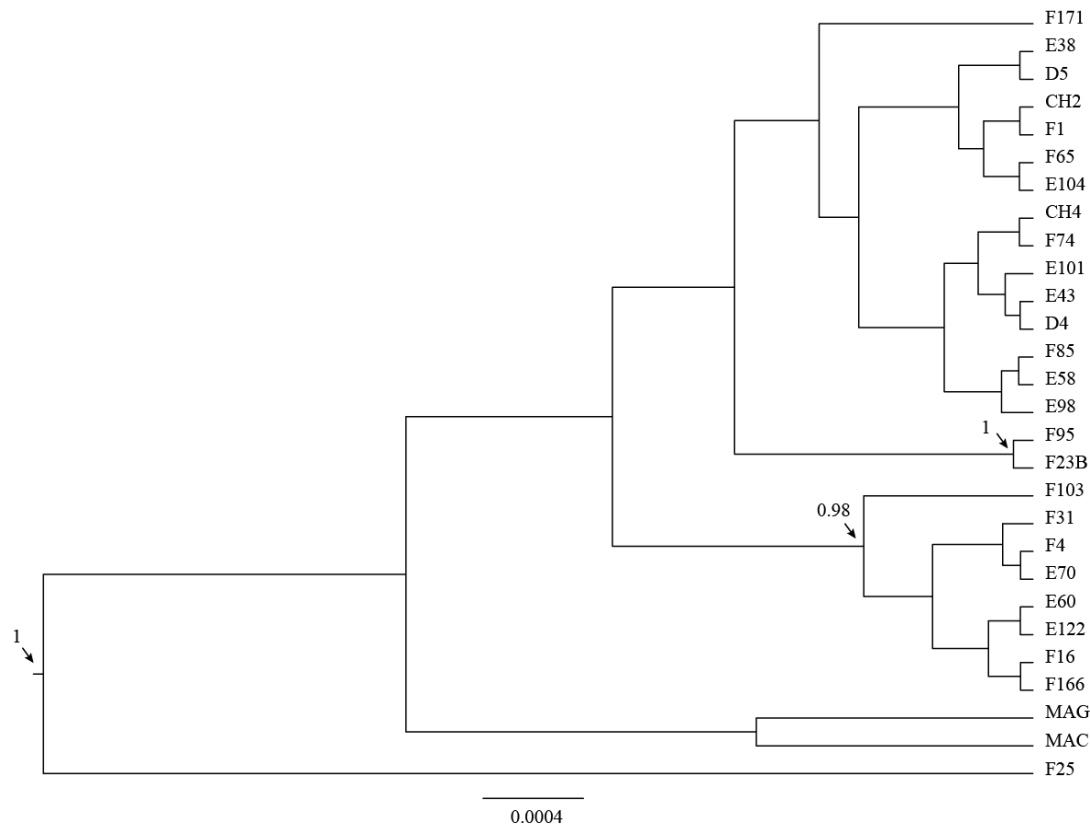
Supplementary Fig 2.e (mt LSU)



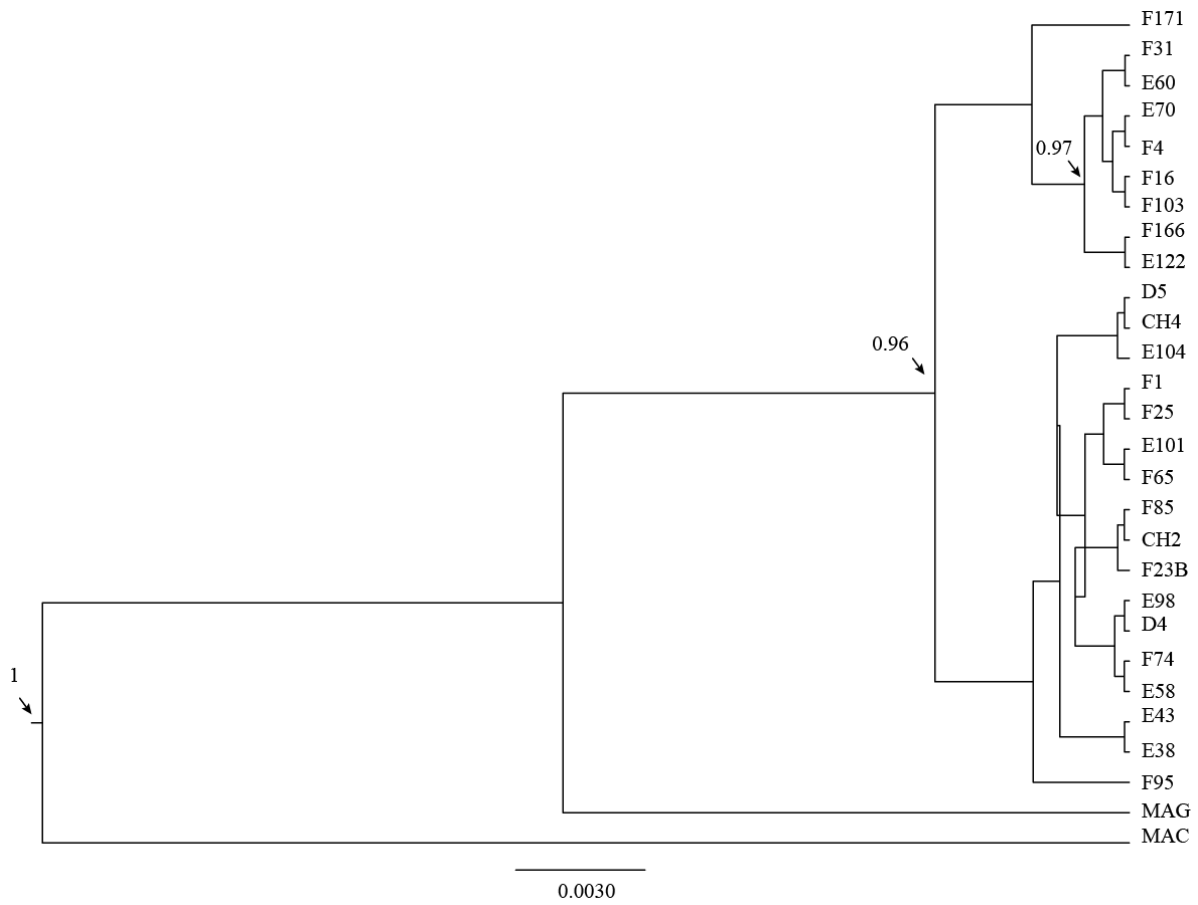
Supplementary Fig 2.f (mt SSU)



Supplementary Fig 2.g (nu LSU)

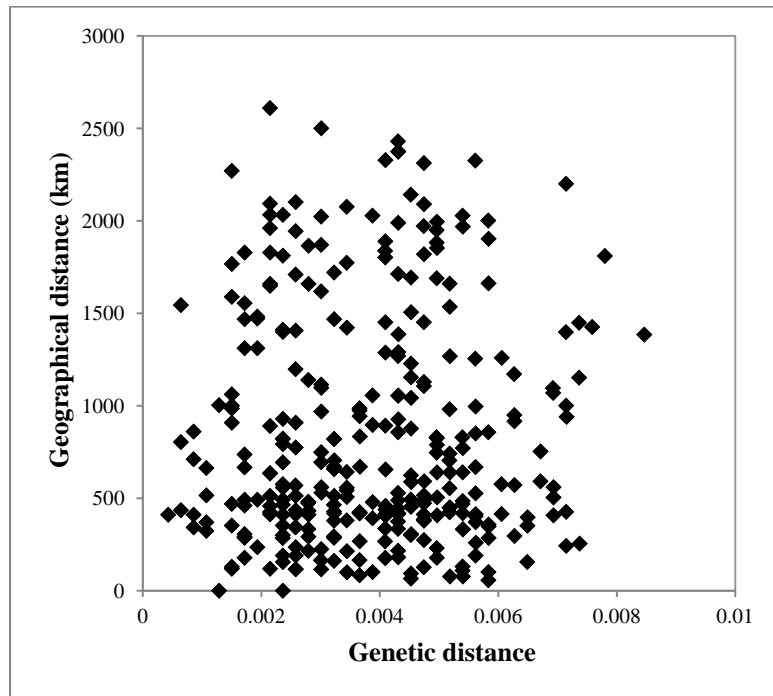


Supplementary Fig 2.h (nu SSU)



Supplementary Fig 2.i (RPB2 7_11)

Supplementary Figure 3: Correlation results



Results:

$r(A,B)$	0.026
p-value	
unilateral	0.378
Alpha	0.05

Null hypothesis (absence of correlation between the genetic distance and the geographical distance) cannot be rejected; therefore the correlation between genetic distance and geographical distance is not significant.



Chapitre II :

Etude de génétique des populations de
Tuber aestivum à l'aide de marqueurs
microsatellites spécifiques



Chapitre II : Etude de génétique des populations de *Tuber aestivum* à l'aide de marqueurs microsatellites spécifiques.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique de *Tuber aestivum*. Comme nous avons pu le voir précédemment, cette espèce présente une aire de répartition géographique assez large couvrant toute l'Europe et allant même jusqu'en Chine et en Afrique du Nord. De nombreuses études se sont intéressées au statut taxonomique ainsi qu'à la culture de cette espèce. Néanmoins, aucune étude, à notre connaissance, n'a caractérisé sa diversité génétique à grande échelle. Sa grande aire de répartition peut laisser penser que l'espèce possède un grand polymorphisme et qu'il existe des différenciations entre populations.

Tout d'abord, nous avons, en nous appuyant sur des éléments historiques et des analyses effectuées, répondu à un article récent qui a suggéré que le réchauffement climatique (notamment dû à l'activité humaine et l'industrialisation) a élargi l'aire de répartition de *Tuber aestivum* (Büntgen *et al*, 2011). Büntgen et collaborateurs limitent l'aire de répartition de l'espèce par rapport à sa réelle répartition. Nous avons avancé dans cet article que *Tuber aestivum*, était présente largement à travers l'Europe et notamment aux siècles derniers. Les résultats de l'article montrent que le réchauffement climatique n'a eu que peu d'influence sur *Tuber aestivum*. Notre réponse constitue l'article « Is climate change altering the geographic distribution of truffles ? » publié dans « Frontiers in Ecology and the Environment » (Article 2).

Pour étudier la diversité génétique de *Tuber aestivum*, nous avons tout d'abord développé des marqueurs microsatellites spécifiques par une approche de « direct shotgun pyrosequencing ». En effet, l'utilisation de marqueurs microsatellites développés sur d'autres espèces du genre *Tuber*, telles que *Tuber melanosporum* ou *Tuber magnatum*, n'a pas permis d'obtenir d'amplification. La technique de « direct shotgun pyrosequencing » permet l'obtention de séquences contenant des motifs SSR par simple pyroséquençage d'ADN génomique. Grâce à cette approche, 7784 microsatellites pour un total de 195 Mpb ont pu être identifiés à partir d'un seul ascocarpe de *Tuber aestivum*. Cette méthode, très rapide et relativement moins coûteuse que les méthodes en banques enrichies par exemple, nous a permis le développement de 15 marqueurs microsatellites polymorphes. Des tests de diversité ont été effectués sur 7 populations de *Tuber aestivum* et les résultats très prometteurs indiquent un fort polymorphisme au sein de l'espèce *Tuber aestivum*. Le développement des marqueurs microsatellites par technique de pyroséquençage direct a fait l'objet de la publication « First identification of polymorphic microsatellite markers in the Burgundy truffle, *Tuber aestivum* (*Tuberaceae*) » dans « Applications in Plant Sciences » (Article 3).

Par la suite, nous avons utilisé les marqueurs microsatellites développés sur des individus provenant de différentes localisations en Europe. Cette première étude de diversité génétique *Tuber aestivum* a regroupé 174 individus. En utilisant les 15 marqueurs SSR développés, nous avons pu identifier quatre sous populations différenciées qui ne correspondent pas, pour la majorité, à une répartition géographique. Cependant, un des clusters se différencie des autres à la fois par sa situation géographique (sud de la France et Espagne) et ses caractéristiques génétiques (présence d'allèles rares). Ces résultats préliminaires pourraient indiquer l'existence d'un écotype particulier attaché à une écologie méridionale, *Tuber aestivum sensu stricto*. Cette étude a permis pour la première fois de mettre en évidence l'existence d'écotypes au sein de l'espèce *Tuber aestivum*. De nouvelles analyses avec un plus fort échantillonnage pourraient permettre de caractériser à la fois d'un point de vue écologique et génétique les différents écotypes existant au sein de l'espèce. L'utilisation des marqueurs SSR développés serait un outil pertinent pour la mise en place de labels économiques via le typage moléculaire de truffes. Cette dernière partie du chapitre fait l'objet d'un article « Ecotypes identification using specific SSR markers in *Tuber aestivum* Vittad European populations » qui sera prochainement soumis (Article 4).

Article 2: Is climate change altering the geographic distribution of truffles ?

Article accepté et publié dans « Frontiers in Ecology and the Environment » (a peer-reviewed journal)

Auteurs :

Richard Splivallo^{1*}, Rengenier Rittersma², Nayuf Valdez¹, Gérard Chevalier³, **Virginie Molinier**⁴, Daniel Wipf⁴, et Petr Karlovsky¹

¹Molecular Phytopathology and Mycotoxin Research, University of Goettingen, Goettingen, Germany;

²Beltheim-Heyweiler, Germany;

³Résidence Cristelle, Cournon d'Auvergues, France;

⁴UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB, Pôle IPM CNRS ERL 6300, Dijon, France

Pour une meilleure compréhension, l'article de Büntgen *et al*, 2011 « Truffles and climate change » a été placé juste avant l'article 2. En effet, « Is climate change altering the geographic distribution of truffles ? » est un article publié en réponse à celui de Büntgen *et al*, 2011.



Truffles and climate change

The Burgundy truffle (*Tuber aestivum* syn *T. uncinatum*; Wedén *et al.* 2005) rates highly amongst the world's most precious culinary delicacies. Currently, specimens are valued around €600 (~US\$820) per kilogram, depending on production rate, culinary quality, and consumer demand. In contrast with that of the Périgord black truffle (*T. melanosporum*) and the Piedmont white truffle (*T. magnatum*), the natural habitat of the Burgundy truffle is less well recognized (Figure 1a). Indeed, surprisingly little is known about the physiology and ecology of many *Tuber* spp (Phylum Ascomycota; Bertault *et al.* 1998; Martin *et al.* 2010), in part because of their hypogeous (below-ground) life cycle (Trappe and Claridge 2010) and the general lack of knowledge regarding the drivers of fruiting-body growth in ectomycorrhizal fungi (Gange *et al.* 2007).

A trained truffle dog (breed: Lagotto Romagnolo), attracted by the intense smell of numerous volatile compounds emitted by the hypogeous fruiting body, detected a mature *T. aestivum* specimen (weight: 414 g; volume: 407 cm³; diameter: ~10 cm; value: ~€200 [~US\$274]; Figure 1,

b–d) within a mixed oak/beech forest in southwest Germany, near Lake Constance (47.72°N, 8.88°E). The testaceous gleba (or spore-bearing tissue) with light venation was perfectly developed, and the distinctive ring structures visible on the surface (Figure 1e) may possibly indicate growth increments. An additional 2 kg of Burgundy truffle was collected in the surrounding area, with individual weights between 5 g and 80 g. Existence of Burgundy truffle north of the arc of the European Alps and west of Lake Constance has hitherto rarely been reported. Between August and December 2010, we conducted sporadic dog-based surveys for truffles, which revealed >70 sites of seven *Tuber* spp including *T. aestivum*, *T. brumale*, *T. excavatum*, *T. fulgens*, *T. macrosporum*, *T. mesentericum*, and *T. rufum*. The discovery of mature *T. brumale* specimens in early November was a particular surprise, given that this species usually fruits from January–March.

Whether an anomalously warm summer and cold autumn (Figure 1f), in conjunction with a precipitation surplus, proved conducive to producing such an unusually large truffle specimen remains speculative. However, the discovery of numerous smaller fruiting bodies in the same

area may be indicative of a climate-induced species' range expansion. We hypothesize that plentiful truffle harvest – now for the first time documented in southwest Germany, far outside the traditional cultivation region – may not simply be related to short-term weather variations but rather could be a result of longer-term climate change, given that below-ground truffle fruiting under favorable soil conditions appears to be generally insulated from weather fluctuations. The truffle–host symbiosis and associated carbohydrate metabolism, however, complicate tracking climate responses due to lag effects, since the fungi must compete with the host plant's water and carbon demands. Soil characteristics (eg temperature, moisture) and microorganism activities may also enhance or inhibit subterranean mycelial growth and fungal fruiting (see Figure 2 for a schematic overview of truffle ecology).

Evidence of Burgundy truffle presence in southwest Germany – a region where *Tuber* spp are classified as Very Rare or even Extinct on the IUCN Red List – may suggest a climate-induced biome shift, in line with extended growing-season length (Peñuelas *et al.* 2009), likely triggered by increasing average temperatures (Fischer and Schär 2009). Recent truf-

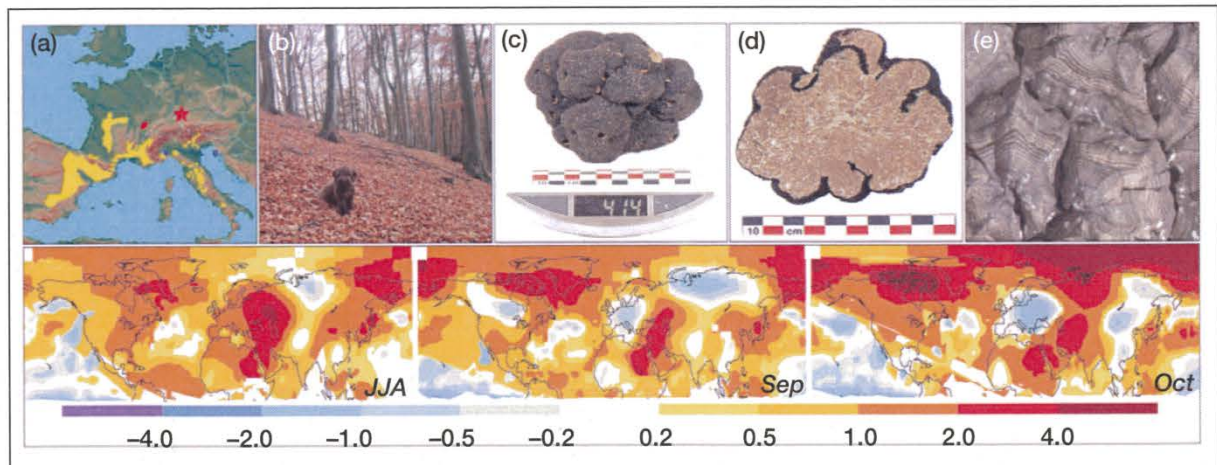


Figure 1. (a) Distribution of Périgord black truffle (yellow) and Piedmont white truffle (blue), and the traditional range of Burgundy summer truffle (red). The star indicates the find location in Germany, with a trained truffle dog (b). Full (c) and cross-section (d) images of the specimen, showing the gleba (spore-bearing tissue). (e) Microscopic amplification of truffle peridium (surface) reveals horizontal black/gray layers that, to our knowledge, have never been reported before, and may represent growth increments. (f) Temperature anomalies of 2010 with respect to 1901–2000, as obtained from the Goddard Institute for Space Studies (www.giss.nasa.gov/). JJA = June–August.

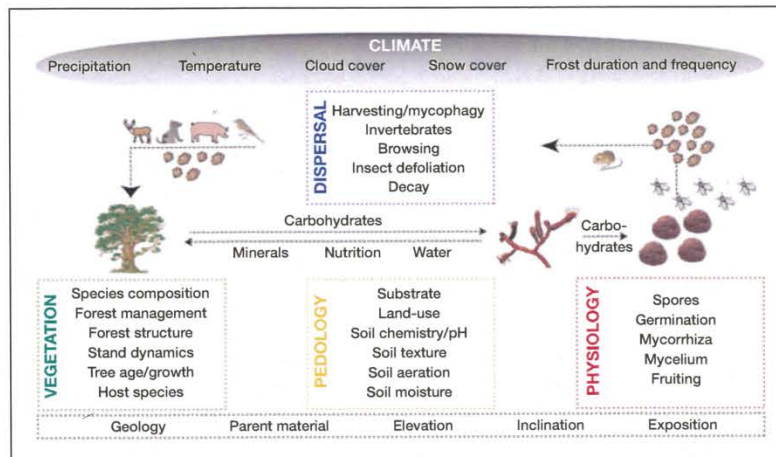


Figure 2. Holistic perspective of the numerous, interrelated biotic and abiotic factors that drive truffle productivity and phenology.

findings as far north as Gotland (a Baltic island off the southeast Swedish coast) further suggest a close link to environmental change (Wedén *et al.* 2005). Assessment of high-resolution climatic data (Mitchell and Jones 2005) revealed spatial differences of $\sim 0.5^{\circ}\text{C}$ between mean temperatures in Burgundy and our study site, which corresponded with temporal changes in mean temperatures observed in Europe between the early and late 20th century. An average warming trend of 0.5°C per century, depending on seasonal, regional, and methodological constraints, would translate in an isothermal upward (northward) shift of ~ 100 miles (~ 110 km). Various model simulations forecast a substantially warmer 21st century (Fischer and Schär 2009), which would likely continue to alter the geographical, ecological, and physiological range of mycorrhizal fungi and their host plants.

Projected environmental changes across the Mediterranean truffle foci – where future temperature and precipitation rates are expected to rapidly increase and decrease, respectively (Giorgi 2006) – will be critical for truffle species with limited dispersal capabilities, such as *T. melanosporum* or *T. magnatum*. Likewise, declining harvests will boost the economic value of truffles. Understanding different ecosystem responses to projected climate change (ie with opposing sig-

nals south and north of the Alps), as well as the complex interplay of biotic and abiotic factors (Figure 2), is thus of enormous scientific, economic, and gastronomic importance (Hall *et al.* 2003; Trappe and Claridge 2010).

Our findings encourage rethinking the distribution and dynamics of European truffle populations, provide insight into the dark world of hypogeous fungi, and appear relevant to truffle cultivation efforts. Formerly time-consuming, expensive, and with little guarantee of success, truffle plantations may become more promising for *T. aestivum* and even feasible for *T. melanosporum* in a warmer climate north of the Alps.

Ulf Büntgen^{1,2*}, Willy Tegel³, Simon Egli¹, Ulrich Stobbe⁴, Ludger Sproll⁴, and Nils C Stenseth⁵

¹Swiss Federal Research Institute for Forest, Snow and Landscape, Birmensdorf, Switzerland (*buentgen@wsl.ch); ²Oeschger Centre for Climate Change Research, Bern, Switzerland; ³Institute for Forest Growth, University of Freiburg, Freiburg, Germany; ⁴Chair of Forest Botany, University of Freiburg, Freiburg, Germany; ⁵Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis, University of Oslo, Oslo, Norway

Bertault G, Raymond M, Berthomieu A, *et al.* 1998. Trifling variation in truffles. *Nature* 394: 734.

Fischer EM and Schär C. 2009. Future

changes in daily summer temperature variability: driving processes and role for temperature extremes. *Clim Dynam* 33: 917–35.

Gange AC, Gange EG, Sparks TH, and Boddy L. 2007. Rapid and recent changes in fungal fruiting patterns. *Science* 316: 71.

Giorgi F. 2006. Climate change hot-spots. *Geophys Res Lett* 33: L08707.

Hall IR, Yun W, and Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnol* 21: 433–38.

Martin F, Kohler A, Murat C, *et al.* 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033–38.

Mitchell TD and Jones PD. 2005. An improved method of constructing a database of monthly climate observations and associated high-resolution grids. *Int J Climatol* 25: 693–712.

Peñuelas J, Rutishauser T, and Filella I. 2009. Phenology feedbacks on climate change. *Science* 324: 887–88.

Trappe J and Claridge AW. 2010. The hidden life of truffles. *Sci Am* 302: 78–84.

Wedén C, Danell E, and Tibell L. 2005. Species recognition in the truffle genus *Tuber* – the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environ Microbiol* 7: 1535–46.

doi:10.1890/11.WB.004



Plastic: matching material with usage

We are in the midst of a global plastic pollution crisis. Plastic consumption has doubled over the past three decades (Thompson *et al.* 2009) and, as a result, large areas of our terrestrial and aquatic environments are now overrun with discarded plastic. Although plastic pollution in the environment is an issue that must be addressed, the substance plays an integral role in human lives and technology. For example, in automobiles, plastic replaces metal parts to increase fuel efficiency by decreasing weight (see www.bpf.co.uk). Thus, a total ban on plastic would be impractical. How, then, should we try to curb global plastic consumption? A sensible way to alleviate consumption would be to identify those products for which its usage is unnecessary.

It is now a common practice to use millennia-lasting plastics for everyday items, such as bags or disposable



Is climate change altering the geographic distribution of truffles?

Peer-reviewed letter

Truffles (*Tuber* spp) – the aromatic fruiting bodies of fungi that grow underground and symbiotically colonize the roots of hazels, oaks, and other trees or shrubs – are a luxury food item, with prices often comparable to those of caviar. The exorbitant prices of truffles reflect a decreasing worldwide production (Hall *et al.* 2003) and an increasing international demand. By mostly relying on a rare occurrence of the Burgundy truffle (*Tuber uncinatum* syn *T. aestivum*; Paolocci *et al.* 2004; Wedén *et al.* 2005) (Figure 1a) in southwest Germany, Büntgen *et al.* (Front Ecol Environ 2011; 9[3]: 150–151) speculated that climate change has expanded the species' geographic distribution. Here, on the basis of historical data and an updated distribution map of the Burgundy truffle, we offer an alternative view to Büntgen *et al.*'s hypothesis.

Historical evidence suggests that truffles were present throughout Europe well before late 19th-century climate change. Since the 17th century, truffles have been harvested in regions of the UK, Slovakia, Poland, Austria, and Germany (Robinson 1691–1693; Brückmann 1730; Rittersma 2010, a and b). The sudden interest in truffles outside of traditional truffle-consuming countries like France and Italy resulted from the emergence of the court society, which reached its zenith between 1648 and 1789 (Rittersma 2010b). During the 19th century, Germany emerged as a truffle-consuming nation that contributed to the mycological, culinary, and commercial spectrum of the European truffle tradition of that time (Figure 1b; Rittersma 2010a). This clearly demonstrates that truffles' perception and appreciation in Germany and elsewhere in Northern Europe has been strongly determined by culture.



Figure 1. (a) Characteristic morphology of the Burgundy truffle, *Tuber uncinatum*. The inside tissue (or gleba, left) bears mature spores and is light brown with characteristic white veins, whereas the outer layer (or peridium, right) is melanized and black. (b) 19th-century illustration of women carrying baskets filled with truffles in Baden, in southwestern Germany (from Dumaine J-M. 2010. Trüffeln, die heimischen Exoten).

The natural habitat of the Burgundy truffle covers Europe (WebFigure 1a, based on data from Chevalier and Frochot [1997] and Splivallo *et al.* [2012]). Büntgen *et al.*'s distribution map, which limited the occurrence of the Burgundy truffle to a few European sites, is incomplete, perhaps because the authors attempted to distinguish summer Burgundy truffles from winter Burgundy truffles. If so, this distinction has no taxonomical relevance because winter and summer Burgundy truffles are a single species (Paolocci *et al.* 2004; Wedén *et al.* 2005) and have similar aromas (Splivallo *et al.* 2012). The Burgundy truffle's European-wide distribution indicates that the species can adapt to a broad temperature range. In beetles, upper thermal tolerance has been positively linked to the extent of geographic ranges (Calosi *et al.* 2010); similarly, the high tolerance of the Burgundy truffle to both high and low temperatures suggests that, contrary to the hypothesis of Büntgen *et al.*, climate change might have a minimal effect on its geographic distribution.

In wines, a few growing regions (eg Bordeaux) traditionally dominated the market until the emergence of global competition in the 20th century. A similar trend is currently happening with truffles, the market for which has been overshadowed in recent decades by the two most expensive species: the Piedmont (*T. magnatum*, ~€5000 kg⁻¹) and the Périgord (*T. melanosporum*, ~€2500 kg⁻¹) truffle. Being three to ten times

cheaper and more widely distributed than the latter two species, the Burgundy truffle offers an attractive and readily available substitute. The increase in Burgundy truffle demand throughout Europe can be attributed in part to the recent creation of numerous truffle grower/hunter associations (eg The German Truffle Association [www.ahrtrueffel.com], The Swiss Burgundy Truffle Association [www.uncinatum.ch/web], The Hungarian Truffle Growers Association [www.szarvasgombaegyesulet.hu]). These associations contribute to raising public awareness of the Burgundy truffle by conducting educational efforts, organizing events (eg truffle tastings), and supporting the establishment of truffle orchards.

Truffles might have colonized Europe about 10 000 years ago, after the last glacial period, as documented for the Périgord truffle (Murat *et al.* 2004). This hypothesis has not yet been tested for the Burgundy truffle. Geographic and genetic distance were not correlated when considering all eight populations in our study (WebFigure 1); however, a significant correlation was observed when considering only the five populations on the gradient from the South of France toward the UK. This indicates that the overall European distribution of the Burgundy truffle does not result from isolation caused by distance (ie not attributable to range expansion); however, species range expansion might have happened northward from southern France toward the UK.

Considering that truffles were harvested throughout Europe during the 17th century, the Burgundy truffle might have, similarly to the Périgord truffle (Murat *et al.* 2004), recolonized Europe from some southern refugia, possibly following the last ice age. The observed correlation is not necessarily evidence of a climate-driven range expansion, however, given that other factors (eg competition with other fungi, shift in host-plant range) might lead to such a finding. Clearly, more specimens and a more comprehensive approach, accounting for all variables (eg climate, soil, associated species), will be needed to identify the possible driving forces behind the Burgundy truffle's current distribution.

Here, our analysis suggests that climate change that started in the late 19th century has had little effect on the present distribution of the Burgundy truffle. Büntgen *et al.*'s conclusions might nevertheless apply to other truffle species with narrower ranges and higher commercial values (eg Périgord or Piedmont truffles). If climate does limit the distribution of the latter two species, even the slight warming in northern Europe envisioned by Büntgen *et al.* might induce northern expansion. In addition to temperature, other factors – including precipitation, soil properties (Chevalier *et al.* 2001), and mating type (Rubini *et al.* 2011) – determine whether truffles produce fruiting bodies. Successful truffle cultivation will consequently succeed only if truffle orchard management shifts from current empirical practices to practices based on scientific evidence. Increasing temperatures alone will not be sufficient for successful truffle cultivation in more northern parts of Europe.

Richard Splivallo^{1*}, Rengenier Rittersma², Nayuf Valdez¹, Gérard Chevalier³, Virginie Molinier⁴, Daniel Wipf⁴, and Petr Karlovsky¹
¹Molecular Phytopathology and Mycotoxin Research, University of Goettingen, Goettingen, Germany
 (*ricsi17@hotmail.com);

²Beltheim-Heyweiler, Germany;
³Résidence Cristelle, Courmon d'Auvergnès, France; ⁴UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB, Pôle IPM CNRS ERL 6300, Dijon, France

- Brückmann FE. 1730. *Epistolae itinerarium XX: de tuberibus terrae*. Wolfenbüttel, Germany.
- Calosi P, Bilton DT, Spicer JJ, *et al.* 2010. What determines a species' geographical range? Thermal biology and latitudinal range size relationships in European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). *J Anim Ecol* 79: 194–204.
- Chevalier G and Frochot H. 1997. *La truffe de Bourgogne: Tuber uncinatum* Chatin. Levallois-Perret, France: Editions Pétrarque.
- Chevalier G, Gregori G, Frochot H, and Zambonelli A. 2001. The cultivation of the Burgundy truffle. In: Bencivenga M and Granetti B (Eds). *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. 3–6 Jul 2001. Spoleto, Italy: Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano.
- Hall IR, Yun W, and Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnol* 21: 433–38.
- Murat C, Díez J, Luis P, *et al.* 2004. Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial recolonization routes of the Périgord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytol* 164: 401–11.
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, *et al.* 2004. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? *FEMS Microbiol Lett* 235: 109–15.
- Rittersma RC. 2010a. Die verspätete Trüffelnation. Zu Geschichte, Gegenwart und Zukunft der Trüffel in Deutschland. In: Dumaine JM and Wojtko N (Eds). *Trüffeln: die heimischen Exoten*. Aarau/München, Germany: AT Verlag.
- Rittersma RC. 2010b. Only the sky is the limit of the soil. Manifestations of truffle mania in Northern Europe in the 18th century. In: Bencivenga M and Granetti B (Eds). *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. 3–6 Jul 2001. Spoleto, Italy: Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano.
- Robinson T. 1691–1693. An account of the Tuberæ Terræ, or truffles found at Rushton in Northamptonshire. *Philos T Roy Soc London* 7: 824–26.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, *et al.* 2011. *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inocu-

lated host plants. *New Phytol* 189: 723–35.

Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, *et al.* 2012. Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytol* 194: 823–35.

Wedén C, Danell E, and Tibell L. 2005. Species recognition in the truffle genus *Tuber* – the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environ Microbiol* 7: 1535–46.

doi:10.1890/12.WB.020



Illuminating the mysterious world of truffles

On the basis of discovering ~2 kg of truffles (belonging to several *Tuber* spp, including a >410-g mature Burgundy truffle [*T. aestivum* syn *uncinatum*]) at >70 sites in southwest Germany, we postulated in our original letter that ongoing climate change was one possible factor contributing to species-specific range shifts, as well as to variation in fruiting body production and maturation, in truffles.

A warming-induced extension of the growing period – together with redistributed precipitation regimes – was hypothesized to likely affect the optimum rather than the entire distribution of individual truffle species. The detection of not only *T. aestivum* but also *T. brumale*, *T. excavatum*, *T. fulgens*, *T. macrosporum*, *T. mesentericum*, and *T. rufum* in the same region and at the same time, together with substantial temperature anomalies, suggested that climatic effects were involved. Associated environmental changes may have impacted conditions at local to regional scales but did not necessarily shift the geographic scope of entire ecosystems. Our “hypogeous evidence”, in line with European-wide myco-phenological observations (Kausrud *et al.* 2012), supports a reported long-term decline in Périgord black truffle (*T. melanosporum*) harvests across its natural and cultivated Mediterranean habitats (Hall *et al.* 2003; Mello *et al.* 2006). A possible reason for this southern European truffle yield decrease is a loss in soil moisture.

Nevertheless, we agree with Spli-

Article 3 : First identification of polymorphic microsatellite markers in the Burgundy truffle, *Tuber aestivum* (Tuberaceae).

Accepté et publié dans « Applications in Plant Sciences » (a peer-reviewed journal).

Auteurs :

Virginie Molinier^{1§}, Claude Murat^{2§}, Emmanuelle Morin², Armelle Gollotte³, Daniel Wipf¹ et Francis Martin²

¹UMR Agroécologie INRA 1347/AgroSup/Université de Bourgogne, Pôle IPM ERL 6300 CNRS, BP 86510, 21065 Dijon CEDEX, France;

²UMR “Interaction Arbres Microorganismes”, Centre INRA Nancy, 54280 Champenoux, France

³Inopiant, 13 rue des Souhais, 21110 Aiserey, France

[§]Ces auteurs ont contribué de manière égale à cet article.

FIRST IDENTIFICATION OF POLYMORPHIC MICROSATELLITE MARKERS IN THE BURGUNDY TRUFFLE, *TUBER AESTIVUM* (TUBERACEAE)¹

VIRGINIE MOLINIER^{2,5,6}, CLAUDE MURAT^{3,5}, EMMANUELLE MORIN³, ARMELLE GOLLOTTE⁴, DANIEL WIPF², AND FRANCIS MARTIN³

²UMR Agroécologie INRA 1347/AgroSup/Université de Bourgogne, Pôle Interactions Plantes Microorganismes ERL 6300 CNRS, BP 86510, 21065 Dijon CEDEX, France; ³UMR "Interaction Arbres Microorganismes", Centre INRA Nancy, 54280 Champenoux, France; and ⁴Inopiant, 13 rue des Souhais, 21110 Aiserey, France

- **Premise of the study:** *Tuber aestivum*, the most common truffle in Europe, plays an important role in the commercial truffle market. For the first time, microsatellite primers were developed to investigate polymorphism within this species.
- **Methods and Results:** Using direct shotgun pyrosequencing, 15 polymorphic microsatellites were identified out of the 7784 perfect microsatellites present in the 534 620 reads obtained. Tested on 75 samples, these microsatellites were highly polymorphic. The number of alleles varied from four to 15, and the expected heterozygosity ranged from 0.266 to 0.620. A multilocus analysis allowed the identification of 63 genotypes over the 75 samples analyzed.
- **Conclusions:** Direct shotgun pyrosequencing is a fast and relatively low-cost technique allowing identification of microsatellites in nonmodel species. The microsatellites developed in this study will be useful in population genetic studies to infer the evolutionary history of this species.

Key words: direct shotgun pyrosequencing; polymorphism; truffle; *Tuber aestivum*; Tuberaceae.

Truffles are edible ectomycorrhizal fungi belonging to the genus *Tuber* P. Micheli ex F. H. Wigg. and living in symbiosis with different host trees. More than 100 *Tuber* species exist in the world but only a few, such as *T. magnatum* Picco, *T. melanosporum* Vittad., and *T. aestivum* Vittad., have interesting organoleptic qualities. The first two species have a natural distribution restricted to limited European countries, but *T. aestivum* has a natural distribution across Europe. Previous studies utilizing random-amplified polymorphic DNA (RAPD) or inter-simple sequence repeat (ISSR) markers and sequencing of a few genes suggested the existence of genetic diversity between *T. aestivum* populations (Gandeboeuf et al., 1997; Mello et al., 2002; Weden et al., 2004). However, the absence of codominant molecular markers, such as microsatellites or simple sequence repeats (SSRs), precluded the investigation of *T. aestivum* population genetics.

Recently, next-generation sequencing techniques have provided new prospects to develop microsatellite markers in nonmodel

species, quickly and for relatively low costs (Abdelkrim et al., 2009; Csencsics et al., 2010; Perry and Rowe, 2011). Direct shotgun pyrosequencing (DSP) has been successfully used for the identification of microsatellites in animals or plants but, to our knowledge, this approach has never been used for ectomycorrhizal fungi. Recently the sequencing of the black truffle genome revealed a substantial richness in repeated sequences such as microsatellites (Murat et al., 2011). This result suggested that a DSP approach could be used for identifying microsatellites in *Tuber* species. The aim of our study was therefore to use DSP to identify, for the first time, polymorphic microsatellites in the economically important truffle *T. aestivum*.

METHODS AND RESULTS

Total genomic DNA was isolated from an ascocarp of *T. aestivum* harvested in Haute-Saône (France) (MD4) (Appendix 1, group A). DNA was extracted from frozen tissues with a cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol available at the MYCORWEB website (<http://mycor.nancy.inra.fr/>). A total of 150 µg of genomic DNA was sent to Genoscope (Evry, France). Direct shotgun sequencing occurred in a 1/2 plate optimized run of 454 GS-FLX Titanium and produced 534 620 reads. The fasta and quality files generated were trimmed using the program "TrimSeq.pl" to trim raw sequencing reads at both ends based on moving averages of quality scores (phred = 20) and to remove reads smaller than 300 bp. After trimming and editing, 411 374 reads corresponding to 195 Mbp were retained for microsatellite identification. MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/download/misa.pl>) was used to identify di-, tri-, tetra-, penta-, and hexanucleotide simple sequence repeat markers. Using this software, a total of 7784 perfect microsatellites were identified (2519 di-, 3568 tri-, 1248 tetra-, 324 penta-, and 125 hexanucleotide repeat motifs). Using the MISA output files, only microsatellites beginning between 100 and 300 bp from the 5' ends of the reads were selected. After this step, 181 microsatellites with more than 10 repeats were obtained. WebSat (Martins et al., 2009) and Primer3

¹Manuscript received 4 May 2012; revision accepted 5 August 2012.

The authors thank Genoscope for financing the *Tuber aestivum* genome sequencing in the TUBEREVOL project. The work presented was also supported by the Conseil Régional de Bourgogne (Program Jeune Chercheur Entrepreneur; grant 20100112095254682-1). The authors thank G. Chevalier, H. Frochot, P. Déquéant, and D. Besson for providing *T. aestivum* samples. The authors thank the strategic platform "GENTYANE" INRA, Ibis 2009, and its group leader C. Poncet. The authors thank Krista Plett for English editing of this manuscript.

⁵These authors contributed equally to this work.

⁶Author for correspondence: virginie.molinier@dijon.inra.fr

TABLE 1. Characteristics of the primers developed in *Tuber aestivum* for the 15 selected microsatellites.

Locus	5' end-labeled dye	Primer sequences (5'–3')	Repeat motif	Size range (bp)	T_a (°C)	EMBL accession no.
aest1	FAM	F: AAATAACGCTCCAGATCCCTTT R: TAGAGAGGTTCTAGCCGTCAGG	(CCACTC) ₁₀	236–296	60	HE793313
aest6	FAM	F: CGTTTATTGTTCGCTTTTCTC R: TAAGCTACTGAGCGACAGGTTG	(AGTAAT) ₆	212–236	60	HE793314
aest7	FAM	F: GAGAACGTGATGTGTATGGTT R: ATGAGATGCAAGCACTGTAGGA	(ACAGC) ₆	256–286	60	HE793315
aest10	VIC	F: AATAAAGCACCAGATCACCACC R: GACTAGCGAAAGGGGATGAGTA	(AGTAC) ₆	280–310	60	HE793316
aest15	VIC	F: GACTTTTCCGTCCACTTGTTC R: GATCCATTTCATCCATCCATACC	(GGATG) ₆	297–322	60	HE793317
aest18	FAM	F: TATTCCTATCCACACGACCAC R: AACATTGCTGTTTACGGCTCTT	(ACTG) ₁₁	136–156	60	HE793318
aest24	VIC	F: TGAAAGTGTTAGAGATCGGCAA R: GTACTTCGCCCAGACAGAGAGT	(TCA) ₁₈	292–319	60	HE793319
aest25	FAM	F: AGTTGTTTGTATGATGATGCCG R: ACTGGTATGACACGCTCCAAAT	(ATT) ₁₀	122–140	60	HE793320
aest26	FAM	F: CAAGACAGAGACGCTAATCCCT R: GAGTATGCAATAATGGGTCCGT	(TAT) ₁₁	124–178	60	HE793321
aest27	VIC	F: AAGTGTAGAGATCGGCAAAGC R: CCTCACTCCAGACTTATCCAC	(TCA) ₁₈	314–341	60	HE793322
aest28	VIC	F: ACCTTCTTTTCTGTGGCAAT R: AAATAGTCTGAGGGGAGTCGTG	(TTA) ₁₈	344–452	60	HE793323
aest29	FAM	F: GAGTGGGGAGAATCAGCTCTAC R: TATCCAAATGTTCTGCACTTC	(AGTAC) ₆	186–226	60	HE793324
aest31	VIC	F: TAGATACAGCACCGTAGCACA R: TTTCGTAATTGTCTGTCGGTTG	(CCTAC) ₆	285–325	60	HE793325
aest35	FAM	F: GTATGCGGTAGGTGGGTTTACT R: CTTGTGCTCGTACTCCACTTGT	(TTTC) ₁₀	124–160	60	HE793326
aest36	VIC	F: ACAATACTCACCGACCTTGTCT R: CATGATACAACAGCATCCCG	(GACT) ₁₃	310–350	60	HE793327

Note: EMBL = European Molecular Biology Laboratory; T_a = annealing temperature.

(Rozen and Skaletsky, 2000) were respectively used to check repeats and to design primers for 40 microsatellites randomly selected among the 181 microsatellites previously obtained. The PCR feasibility was checked using OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). Primers were tested in silico using AmpliX software (<http://cm2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>).

To evaluate the microsatellite primers in a PCR reaction, two *T. aestivum* ascocarps were used. DNA was extracted with a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. All PCR amplifications were performed using 30 ng of template DNA in a final volume of 20 µL containing 10× PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 0.125 mM each of dNTPs, 0.5 µM each of forward and reverse primers, and sterile water to adjust to the final volume. PCRs were conducted in a Mastercycler Gradient S PCR system (Eppendorf, Hamburg, Germany) after an initial denaturation of 3 min at 94°C, 30 cycles at 94°C for 25 s, 58°C for 25 s, and 72°C for 40 s, followed by 72°C for 15 min. PCR products were checked on a 1.5% agarose gel. According to Paolocci et al. (2006), the gleba of *Tuber* ascocarps is mainly composed of haploid maternal tissue and the DNA extracted from ascocarps therefore corresponds to a haploid tissue. For this reason, only the microsatellites producing a single band signal were selected for future investigations. Twenty-five primer pairs (62.5%) resulted in good amplification (i.e., one band for both ascocarps).

To identify polymorphic microsatellites, the 25 retained primer pairs were tested with 14 *T. aestivum* samples from different European countries (Appendix 1, group B). Genomic DNA from the 14 ascocarps was isolated from 20 mg of dried gleba as described above. PCR conditions were the same as those described above. PCR products were separated on a 4% agarose gel. Fifteen out of the 25 microsatellites (60%) showed size polymorphisms on 4% agarose gel. To assess more precisely the level of polymorphism, 15 microsatellites were used to perform a genotyping analysis using 5' end-labeled primers (FAM or VIC) (Table 1). Seventy-five samples from seven European populations (Appendix 1, group C) were chosen to perform preliminary genotyping. PCR products were assayed, using 500 LIZ as a size standard, on an ABI 3730XL

sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) at the "Plateforme de Génotypage GENTYANE" (Clermont-Ferrand, France). All amplifications were carried out individually. Allele sizes were analyzed with GeneMapper (Applied Biosystems). Expected heterozygosity (H_e) was calculated using GenAlEx (Peakall and Smouse, 2006) (Table 2). As expected, due to the haploid nature of the ascocarp (Paolocci et al., 2006), each locus gave only one peak for all 75 samples. The number of different alleles per locus ranged from four to 15, and H_e ranged from 0.266 to 0.620. Finally, 63 different multilocus genotypes were obtained from the 75 *T. aestivum* isolates.

CONCLUSIONS

A DSP approach on a single *T. aestivum* ascocarp allowed for the identification of 7784 perfect microsatellites for 195 Mbp (nearly 40 microsatellites per Mbp). To our knowledge, our study is the first report of DSP to identify nuclear polymorphic micro-satellite markers in an ectomycorrhizal fungal species. Indeed, until now, the DSP approach has only been performed on organisms belonging to the Animalia and Plantae kingdoms. This method is very quick and relatively inexpensive compared to the enriched library methods commonly used to develop polymorphic microsatellites. Indeed, with only 1/2 plate of a pyrosequencing run, we were able to identify several thousand microsatellites. DSP is therefore a useful approach to characterize polymorphic markers for nonmodel species. The markers developed in this study will enable future population genetic studies for this truffle species. Moreover, from a commercial point of view, population genetic studies could be useful to label some remarkable ecotypes showing particular alleles. Indeed, because the price of this truffle continues to increase and varies depending on geographical origin, a certificate of "true geographical origin" could be used to avoid fraud in the commercial truffle market.

TABLE 2. Genotyping of the 15 microsatellites for 75 truffle samples belonging to seven *Tuber aestivum* populations.*

"Daix" (n = 23)			"Andal" (n = 9)			"Bedf" (n = 9)			"Drome" (n = 9)			"Tarsul" (n = 11)			"Sweden" (n = 6)			"Valsuz" (n = 8)			
Locus	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e	A	A _e	H _e
aest1	5	3.599	0.722	3	1.976.494	0.617	3	2.314	0.568	4	3.667	0.727	2	1.385	0.278	4	2.286	0.563			
aest6	5	3.058	0.673	2	1.528.346	0.370	2	1.528	0.346	2	1.198	0.165	2	1.800	0.444	2	1.280	0.219			
aest7	5	3.245	0.692	2	1.246.198	0.568	3	1.976	0.494	3	2.373	0.579	2	1.385	0.278	3	2.133	0.531			
aest10	5	3.503	0.715	2	1.246.198	0.667	4	3.000	0.198	4	3.270	0.694	2	1.800	0.444	3	2.667	0.625			
aest15	3	1.924	0.480	2	1.246.198	0.198	2	1.246	0.198	2	1.198	0.165	1	1.000	0.000	2	1.600	0.375			
aest18	3	2.232	0.552	2	1.246.198	0.346	1	1.000	0.000	3	1.754	0.430	3	2.571	0.611	3	2.667	0.625			
aest24	5	2.658	0.624	4	2.070.519	0.716	2	1.246	0.198	5	4.172	0.760	2	1.800	0.444	4	3.556	0.719			
aest25	4	3.023	0.669	3	1.976.494	0.593	1	1.000	0.000	3	1.754	0.430	2	2.000	0.500	4	2.286	0.563			
aest26	6	3.206	0.688	3	1.588.370	0.691	2	1.246	0.198	5	3.457	0.711	2	1.800	0.444	5	4.000	0.750			
aest27	5	2.606	0.616	4	2.070.519	0.716	2	1.246	0.198	4	3.457	0.711	2	1.800	0.444	3	2.909	0.656			
aest28	8	5.136	0.805	2	1.246.198	0.815	3	1.976	0.494	4	3.667	0.727	3	2.571	0.611	4	3.200	0.688			
aest29	4	2.989	0.665	3	2.456.593	0.667	2	1.246	0.198	3	1.754	0.430	3	2.000	0.500	4	2.286	0.563			
aest31	3	2.108	0.526	3	1.588.370	0.765	3	2.314	0.568	2	1.658	0.397	3	2.571	0.611	2	1.882	0.469			
aest35	4	2.372	0.578	2	1.246.198	0.370	2	1.246	0.198	2	1.198	0.165	2	1.385	0.278	2	1.600	0.375			
aest36	3	1.426	0.299	3	1.976.494	0.617	3	2.455	0.593	3	1.458	0.314	1	1.000	0.000	4	2.909	0.656			

Note: A = number of alleles; A_e = number of effective alleles; H_e = expected heterozygosity; n = sample size.

* See Appendix I for locality information.

LITERATURE CITED

- ABDELKRIM, J., B. ROBERTSON, J. A. STANTON, AND N. GEMMELL. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46: 185–192.
- CSENCICS, D., S. BRODBECK, AND R. HOLDEREGGER. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity* 101: 789–793.
- GANDEBOEUF, D., C. DUPRÉ, G. CHEVALIER, P. ROECKEL-DREVET, AND P. NICOLAS. 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Canadian Journal of Botany* 75: 36–45.
- MARTINS, W. S., D. C. S. LUCAS, K. F. S. NEVES, AND D. J. BERTIOLI. 2009. WebSat: A Web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics* 3: 282–283.
- MELLO, A., A. CANTISANI, A. VIZZINI, AND P. BONFANTE. 2002. Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environmental Microbiology* 4: 584–594.
- MURAT, C., C. RICCIONI, B. BELFIORE, N. CICHOCKI, J. LABBÉ, E. MORIN, E. TISSERANT, ET AL. 2011. Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* 48: 592–601.
- PAOLOCCI, F., A. RUBINI, C. RICCIONI, AND S. ARCIONI. 2006. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2390–2393.
- PEAKALL, R., AND P. E. SMOUSE. 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- PERRY, J. C., AND L. ROWE. 2011. Rapid microsatellite development for water striders by next-generation sequencing. *Journal of Heredity* 102: 125–129.
- ROZEN, S., AND H. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Misener and S. A. Krawetz [eds.], *Methods in molecular biology*, vol. 132: Bioinformatics methods and protocols, 365–386. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- WEDÉN, C., E. DANELL, F. J. CAMACHO, AND A. BACKLUND. 2004. The population of the hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland. *Mycorrhiza* 14: 19–23.

APPENDIX 1. Locality information of the different samples and populations of *Tuber aestivum* used in this study.

Group	Sample/Population ID	Country, District*	Latitude*	Longitude*
Group A	MD4	France, Haute-Saône	47°55'12"N	6°4'48.9"E
Group B	E38	Hungary, Northern Great Plain (Debrecen)	47°31'47.906"N	21°38'21.6852"E
	E43	Luxembourg (Rumelange)	49°28'00"N	6°02'00"E
	E58	Switzerland (Lauzanne)	46°31'11.862"N	6°38'0.948"E
	E60	Turkey	ND	ND
	E62	China (Beijing)	39°54'15.1704"N	116°24'26.6"E
	E70	United Kingdom, Bedfordshire	52°8'9.5208"N	0°27'59.943"W
	E98	Romania (Bucharest)	44°26'15.7596"N	26°5'50.520"E
	E104	Sweden, Gotland (Roma)	57°30'28.944"N	18°27'1.116"E
	F1	France, Corsica (Santa Lucia di Moriani)	42°23'11.04"N	9°31'49.08"E
	F23	France, Drôme (Montjoyer)	44°28'38"N	4°51'10"E
	F38	France, Lozère (Montbrun)	44°20'17.02"N	3°30'15.98"E
	F68	France, Var (Ampus)	43°36'26.193"N	6°22'59.7"E
	F166	France, Aube (Vailly)	48°22'9.976"N	4°7'45.637"E
	UMF1	United Kingdom, Norfolk (Watton)	52°34'15.0522"N	0°49'40.882"E
Group C	"Daix"	France, Côte d'Or (Daix)	47°21'6.192"N	4°59'57.4542"
	"Andal"	Spain, Andalusia (Grenada)	37°10'35.3532"N	3°35'52.544"W
	"Bedf"	United Kingdom, Bedfordshire (Bedford)	52°8'9.5208"N	0°27'59.943"W
	"Drome"	France, Drôme (Montjoyer)	44°28'38"N	4°51'10"E
	"Tarsul"	France, Côte d'Or	47°31'57"N	4°59'3.4506"E
	"Sweden"	Sweden, Gotland (Roma)	57°30'28.944"N	18°27'1.116"E
	"Valsuz"	France, Côte d'Or (Val Suzon)	47°24'29"N	4°53'39"E

Note: ND = GPS coordinates not determined.

* Due to the confidentiality between authors and truffle providers, only GPS coordinates of the closest town or village are indicated instead of the precise location.

Article 4 : Ecotypes identification in *Tuber aestivum* Vittad. European populations by using specific SSR markers

Auteurs:

Virginie Molinier^{1,§}, Claude Murat^{2,§}, Armelle Gollotte³, Francis Martin², Daniel Wipf¹

¹ UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/u. Bourgogne, Pôle Interactions Plantes Microorganismes ERL 6300CNRS, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine « Interactions Arbres-Microorganismes », Labex ARBRE, FR EFABA, 54280 Champenoux, France.

³ Inopiant, 13 rue des Souhais, 21110 Aiserey, France.

§Ces auteurs ont contribué de manière égale à cet article.

Title: Ecotypes identification in *Tuber aestivum* Vittad. European populations by using specific

SSR markers

Authors: Virginie Molinier^{1, §}, Claude Murat^{2, §}, Armelle Gollotte³, Francis Martin², Daniel

Wipf¹

[§] both authors contributed equally to this work

¹ UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/u. Bourgogne, Pôle Interactions Plantes
Microorganismes ERL 6300 CNRS, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² INRA, UMR Interactions Arbres-Microorganismes INRA 1136/u. Lorraine, Labex ARBRE,
FR EFABA, 54280 Champenoux, France.

³ Inopiant, 13 rue des Souhais, 21110 Aiserey, France.

Corresponding author:

*Virginie Molinier

UMR Agroécologie, Pôle IPM CNRS ERL 6300, Bât Dommergues, 2^{ème} étage, 17 rue Sully, BP
86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Fax number : +33(0)380693753

Email : molinier.virginie@gmail.com

Abstract

Tuber aestivum Vittad. is a truffle species with a large-scale distribution in Europe and which is also found in North Africa and China. On the truffle market *T. aestivum* is distinguished from *T. uncinatum* Chatin by differences in its maturity period and ecological preferences. However, recent phylogenetic analyses indicated that *T. aestivum* and *T. uncinatum* belong to the same species. Nonetheless, development of microsatellite markers for *T. aestivum* indicated a high genetic diversity in this species.

Here we investigated the genetic structure of *T. aestivum* populations at the European scale using specific SSR markers. DNA was extracted from 174 ascocarps morphologically identified as *T. aestivum* or *T. uncinatum* collected in different European countries. Genotyping using 15 SSR markers, each presenting 5 to 21 alleles, lead to the identification of 144 multilocus genotypes (MLG). A population genetic analysis showed that *T. aestivum* was divided in four different sub-populations which did not correspond to geographical separations. In each sub-population, samples were genetically closer than between sub-populations suggesting the existence of gene flow barriers between sub-populations. One sub-population exclusively corresponded to samples morphologically classified as *T. aestivum* and only present in the south-east of France and Spain. Correspondence analysis indicated that these samples were separated from *T. uncinatum* ones. According to this result, the existence of one particular ecotype corresponding to *T. aestivum sensu stricto* can be postulated. This study will serve as a basis for future ecological characterization of this ecotype.

Introduction

The question "What is a species?" is undoubtedly one of the most passionate issues for biologists. The most commonly used species definition was given by Ernst Mayr who wrote that "Species are groups of actually or potentially interbreeding natural populations, which are isolated from other such groups" (Mayr 1942). This definition was later complemented by the fact that individuals must produce fertile offspring. Nowadays, different species concepts are used. However, among all these concepts, four stand out and appear regularly across all studies (Giraud et al. 2008). The first one is the Biological Species Concept (BSC), which is interested in reproductive isolation and is the one that is the closest to Mayr's definition. The second one is the Morphological Species Concept (MSC) which focuses on morphological differences. This is the most empirical concept to distinguish two species. It is also one of the concepts which can cause homoplasy errors. MSC is subject of debate in the fungal kingdom as the same species can have different morphological characteristics (teleomorph/anamorph) and two species can have similar characteristics (cryptic species). The third concept is the Ecological Species Concept (ESC), which focuses on the adaptation of a species to a particular ecological niche. In this concept, two species cannot share a similar ecological niche as they have different ecological preferences. The last species concept is the Phylogenetic Species Concept (PSC) which focuses on nucleotide divergence. There exist a Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR), related to PSC, whose interest and strength lies in the comparison of more than one gene genealogy (Taylor et al. 2000).

To complete the notion of species concept, it is interesting to take care of the ecotype concept. This concept was developed in 1922 by Turesson and is closely linked to the species concept (Turesson 1922). The ecotype notion is used for a population of one species presenting

specific characteristics adapted to a particular type of environment. This concept of ecotype can also be seen as a step during speciation. As highlighted by Taylor and colleagues (2000) the species concept in fungi is not clearly defined and all here mentioned concepts are used.

The precise identification of true truffles, *Tuber* spp., is important due to the economical value of some species of this genus. Morphological criteria such as fruit body characteristics and spores features are the most common tools applied to determine and discriminate *Tuber* species (Chevalier and Frochot 2002). However, in the last since 20 years the PSC has become more popular in the “truffle community” (Jeandroz et al. 2008; Mello et al. 2002; Paolocci et al. 2004; Roux et al. 1999). ESC and BSC have not yet been used for truffles mainly as crossing truffle isolates under laboratory conditions is not yet possible. However the recent development of polymorphic molecular markers for different truffle species now allows assessment of the gene flow between populations, offering the possibility to identify isolated sub-populations and ecotypes.

Thirty two truffle species have been described in Europe (Ceruti et al. 2003), some of them having a restricted geographic distribution. We can cite here *Tuber magnatum* which is harvested only in Italy and in some countries of the Balkan Peninsula and for which some samples were also found in the South of France. It is also the case for *T. melanosporum*, which is naturally restricted to France, Italy, and Spain. However, other species have a broader distribution; e.g. *T. aestivum* (Vitt.) found all over Europe, from Sweden to Spain, and also recorded in North-Africa (Jeandroz et al. 2008) and China (Song et al. 2005). *T. aestivum*, described for the first time by Carlo Vittadini in 1831 (Vittadini 1831), has a black peridium and a brown gleba (spores bearing). This species presents an ecological polymorphism with different maturity periods and ecological preferences according to its geographic localisation. In 1869,

Chatin based on spore morphological characteristics has split *T. aestivum* in two species: *T. aestivum* and *T. uncinatum* (Chatin 1887). Since that time, *T. aestivum* and *T. uncinatum* have been considered as a single species or as two different species depending on the authors (Dupré et al. 1985; Gandeboeuf et al. 1994; Mello et al. 2002; Mouches et al. 1981; Pacioni et al. 1993; Pacioni and Pomponi 1991; Paolocci et al. 2004; Urbanelli et al. 1998; Weden et al. 2005). Recent phylogenetic analyses suggested that the morphological differences between *T. uncinatum* and *T. aestivum* did not allow discriminating two species and suggested to consider only a single species: *T. aestivum* (Paolocci et al. 2004; Weden et al. 2005; Molinier et al. submitted). However, due to the high genetic diversity observed in this species and its large scale distribution, the presence of ecotypes has been suggested (Le Tacon 2011). The existence of such ecotypes can be assessed by population genetic analyses. Until now, population genetic analyses of *Tuber spp.* have only been conducted for *T. melanosporum* and *T. magnatum* (Murat et al., 2004; Rubini et al., 2005; Riccioni et al. 2008; Murat et al., 2011). The recent development of highly polymorphic microsatellites or simple-sequence repeats (SSRs) now enables the population genetic study of *T. aestivum* (Molinier et al., 2013).

SSRs are short tandem repeat sequences used in different research applications such as fingerprinting, forensics, genetic mapping and also evolutionary studies (Bruford and Wayne 1993; Schlötterer and Pemberton 1998; Selkoe and Toonen 2006). Indeed, due to their co-dominant and multi-allelic nature, their neutral and complex evolution and their ubiquitous distribution, their use in population studies at the genetic level has regularly increased since the early 1990's (Ellegren 2004; Guichoux et al. 2011; Kelkar et al. 2010). SSRs are widely used to study fungal populations (Dutech et al. 2007) such as ectomycorrhizal species (Douhan et al. 2011) and have previously been designed for two truffle species, *T. magnatum* and *T.*

melanosporum, allowing the characterization of their genetic diversity (Bertault et al. 2001; Murat et al. 2011; Riccioni et al. 2008; Rubini et al. 2004). In the present study, we investigate the genetic structure of *T. aestivum* populations at the European scale using specific SSR markers previously developed (Molinier et al. 2013). Our goals were i) to assess the genetic diversity of this species at large scale, ii) to investigate the existence of ecotypes in *T. aestivum* and ii) to verify if it is reliable to maintain the commercial distinction between *T. aestivum* and *T. uncinatum*. Until now the distinction between *T. aestivum* and *T. uncinatum* was done on the basis of MCS but PSC contradicts this distinction. Using a genetic population approach we decided to use for the first time BSC to address the distinction between *T. aestivum* and *T. uncinatum*.

Material and Methods

***Sampling and DNA extraction**

One hundred and seventy four ascocarps of *Tuber aestivum* (fruit bodies) were collected from dried gleba (*exsiccata*) from different European countries (Table 1; Figure 1). For each sample, assignation as '*T. aestivum*' or '*T. uncinatum*' was done according to morphological criteria as described by Chevalier and collaborators (Chevalier et al. 1979).

Each sample was crushed using a sterilized scalpel. DNA was extracted by the Plateforme Gentyane, INRA Clermont-Ferrand. Briefly an extraction buffer (100mM Tris pH=8.0, 50mM EDTA, 5M NaCl, 20mM metabisulfite and 2% RNase (10mg/ml)) was added to the crushed truffles and tubes were incubated at 95°C for 45min. Tubes were then centrifuged for 10min at 4000g (4°C). Supernatants were then transferred into new tubes containing Isopropanol/ammonium acetate (7.5M) (400/25, v/v) and homogenized by inversion. Tubes were centrifuged during 30 minutes at 4000g at 4°C. Supernatants were discarded and pellets were washed once with 70% Ethanol. After drying, pellets were resuspended in 100µL of Tris EDTA 0.1X. DNA concentration was estimated using PicoGreen® and all DNA extracts were adjusted to at 10ng/ml.

***Amplification and Genotyping**

Fifteen polymorphic microsatellite loci previously defined (Molinier et al. 2013) were used aest1, aest7, aest6, aest10, aest15, aest18, aest24, aest25, aest26, aest27, aest28 aest29, aest31, aest35 and aest36. Microsatellite polymerase chain reactions (PCR) were performed in a 10 µL volume containing 2.5µl at 10ng/ml of DNA of *T. aestivum*, 5 µL of AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (AB-life technologies), 0.5 µL primer mix fluorescently labelled forward primer with either 6-FAM, VIC (Eurofins MWG Operon) fluorescent dyes (Molinier et al. 2013) and

2µL sterile water. PCR was performed in a thermocycler Veriti 384 Well (Applied Biosystems) under the following conditions: the PCR started with a cycle of 10min at 95°C, followed by 7 cycles of 30s at 95°C, 30s at 62°C and 30s at 72°C. The PCR further continued with 30 cycles of 30s at 95°C, 30s at 55°C and 30s at 72°C and after 8 cycles of 30s at 95°C, 30s at 56°C and 30s at 72°C, and finished with an elongation cycle of 5 min at 72°C. PCR products were assayed on an ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using GENESCAN™ 500 liz as a size standard. Fragment sizes were analyzed with GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems).

***Genetic structure analyses**

Identification of repeated multilocus genotypes

When analyzing multilocus genotypes from all locations, some individuals carried similar multilocus genotypes. To distinguish true clones from individuals carrying the same multilocus genotype by chance, we used the MLGsim software (Stenberg et al. 2003) that computes the probability of observing a multilocus genotype n times in a population and performed Monte Carlo simulations (10 000 iterations) to determine the probability threshold below which each repeated multilocus genotype can be significantly considered as a true clone (significance level was set to 0.05).

Genetic analyses: N_a , N_e , H and allelic frequencies

For each SSR marker, numbers of alleles (N_a), numbers of effective alleles (N_e), expected heterozygosity (H) and allelic frequencies were calculated using GenAlex (Peakall & Smouse 2006). The expected heterozygosity is a measure of the probability that two copies of the same gene chosen randomly in a population will have different alleles (Nei 1973). The number of multilocus genotypes and genotypic diversity alone as well as versus the number of loci were

calculated using Multilocus 1.3 (Agapow and Burt 2001). The genotypic diversity is the probability that two individuals taken at random have different genotypes. In other words, this value is 0 if every individual has the same genotype and 1 if every individual has a different genotype.

Spatial genetic structure analyses

We investigated population subdivision using the Bayesian clustering method implemented in GENELAND (Guillot 2008; Guillot et al. 2005b). GENELAND infers the best number of genetic clusters, K. The number of genetic groups that best explain the data is given by the value of K in which the Markov chain spent most iterations (Guillot et al. 2005a; Guillot et al. 2005b). The number of clusters was determined by running the MCMC iterations 10 times, allowing K to vary from 1 to 10 with the following parameters: 550000 iterations combined with the uncorrelated frequency model and not using the spatial model. A burn-in of 100 saved iterations (i.e. discarding the 100 first saved iterations) was applied in post-processing. Cluster pairwise Fst calculations were performed using Genepop version 1.2 (Raymond and Rousset 1995). Samples genotypes were treated by correspondence analysis using the ADE4 package of R (<http://www.r-project.org/>) (Dray and Dufour 2007; Thioulouse et al. 1997; Thioulouse and Dray 2007).

Results and Discussion

Multilocus genotypes identification

A total of 174 ascocarps of *T. aestivum* were successfully genotyped using the fifteen SSRs markers. As expected, due to the haploid nature of the ascocarp gleba (Paolocci *et al.*, 2006), each locus resulted in only one peak. All SSRs were polymorphic and presented 5 to 21 alleles (Table 2). The number of alleles identified here for *T. aestivum* is similar to that found for *T. magnatum* that presented 2 to 18 alleles on 315 samples (Rubini *et al.* 2004) and *T. melanosporum* presenting 2 to 18 alleles on 139 samples (Murat *et al.*, 2010).

By combining the SSR profiles, a total of 144 MLG (multilocus genotype) were identified (Table S1). When plotting the genotypic diversity and the number of MLG against the number of loci a plateau was reached with a genotypic diversity of 0.99 for 7 loci; although the number of genotypes still increased until 15 loci (Figure 2). MLGsim analysis (Stenberg *et al.*, 2003) confirmed that the samples showing the same MLG were likely to belong to the same genet (the probability of the MLG sampled belonging to the same genet (P_{Sex}) is lower than 0.01; see Table S1). From the 20 clonal MLG, eight comprised samples from different geographical origins (MLG7, 9, 20, 29, 74, 79, 126, 131; Table S1). Interestingly, samples A1 and CH4 shared MLG29 whereas they were morphologically classified as *T. aestivum* and *T. uncinatum*, respectively. The fact that samples from different populations shares the same MLG could indicate a spread of the genet over Europe. But, we cannot exclude that, if analysing a larger set of SSR, these samples could be differentiated.

Identification of *T. aestivum* sub-populations

To assess the existence of *T. aestivum* sub-populations in Europe, Geneland was used to infer the population structure and to assign individuals to genetic entities. Geneland analysis allowed the identification of four different clusters with highest posterior probabilities. We performed several independent runs with $K=4$ and we produced a cluster map of appurtenance for each location (Figure 3 and Figure 4). The four identified clusters correspond to four putative sub-populations. Interestingly, these sub-populations did not correspond to geographical separations (Figure 3). According to this result, the samples were divided into four sub-populations for further analyses. For each sub-population, the expected heterozygosity (H_e) reflecting the genetic diversity inside the group was high but not different between sub-populations (Table 3). High kinship-coefficient (F_{ij}) values, corresponding to an estimator of the genetic relatedness, were observed when pairs of samples in sub-populations were considered although lower and negative kinship values were found between samples of sub-population 3 compared to samples of other sub-populations (Figure 5). These results confirmed that samples within sub-populations are genetically closer than between sub-populations confirming the hypothesis of gene flow barriers between sub-populations. The fixation index (F_{st}) values between pairs of sub-populations ranged from 0.39 to 0.53 (Table 4). According to Wright 1978, a F_{st} value higher than 0.15 indicates that the differentiation between populations is important nay very important if values are greater than 0.25. Such important F_{st} values mean that sub-populations are extremely differentiated with low gene flow frequencies. Interestingly, this suggests that some individuals from the same location cannot cross. Such a phenomenon was recently observed in the fungus *Laccaria amethystina* (Vincenot et al. 2012). Due to the absence of geographical barriers, the absence of crossing between sub-populations can be explained by genetic barriers or differences

in ecology. Mating type genes have been described for *T. melanosporum* (Rubini et al., 2011). In the genome of *T. aestivum*, one mating type gene (MAT1-2) was identified but actually the second gene (MAT1-1) is not yet known (Murat et al., unpublished). According to the present results it seems important in the future to characterize the MAT1-1 gene and to analyze both genes in the four sub-populations to investigate putative differences that could explain the cross barrier. Several samples belonging to different sub-populations came from the same location or region, but unfortunately the exact harvested site (i.e. host tree, same forest...) is unknown. We therefore cannot exclude that differences in host tree or ecological requirement of subpopulations (e.g. open woodland, mature forest...) can be important.

Are *T. aestivum* and *T. uncinatum* two species according to the biological concept of species?

One of the clonal MLG was composed by two samples, one classified morphologically as *T. aestivum* and one as *T. uncinatum* (see above) and sub-populations 1, 2 and 4 were composed by samples classified morphologically as *T. aestivum* and *T. uncinatum* (Figure 3 and 4). This finding confirmed previous phylogenetic analyses suggesting that the morphological criteria commonly used to characterize *T. aestivum* and *T. uncinatum* are not reliable. Interestingly, the sub-population 3 is composed exclusively by samples morphologically classified as *T. aestivum* (Figures 3 and 4). This cluster is limited to south-east of France and Spain. This cluster was the most differentiated population as shown in Table 4. When all samples were plotted by a correspondence analysis (Figure 6) it seems that some *T. aestivum* samples, corresponding to samples of sub-population 3, are isolated from *T. uncinatum* ones (Figure 6). According to this result, the existence of one particular ecotype corresponding to *T. aestivum sensu stricto* can be

postulated. The ecotype existence in *T. aestivum* has already been suggested but not yet proved (Le Tacon, 2011). For truffle growers, *T. aestivum sensu stricto*, like *T. melanosporum*, is limited to south regions in open woodlands where it can form “brulé” and is harvested in summer. On the contrary, *T. uncinatum sensu stricto* is found all over Europe in more mature forests and forms small or no “brulé”. This ecological difference could explain the isolation of sub-population 3. Unfortunately we have no precise data about sampling sites. Actually, the distinction between *T. aestivum* and *T. uncinatum* is important for the economical market since *T. uncinatum* is more valuable. Moreover, plant inoculated with *T. aestivum* and *T. uncinatum* are both on the market. The morphological criteria as well as the period of harvesting were up to now used to separate *T. aestivum* and *T. uncinatum*. The evidence in this study of an ecotype that could be considered as *T. aestivum* suggested that the use of SSR markers can be reliable in differentiating *T. aestivum sensu stricto* from *T. aestivum sensu largo* including truffles described as *T. uncinatum*. Interestingly, some private alleles not found in other sub-populations exist in *sub-population 3* suggesting that it is not necessary to genotype all SSRs to identify *T. aestivum sensu stricto*. This study is the first one highlighting the existence of ecotypes in European *T. aestivum* species populations and will serve as a basis for future ecological characterization of the *T. aestivum sensu stricto* ecotype.

Acknowledgements:

The authors thank French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12- LABXARBRE-01). The work presented was supported by the “Conseil Régional de Bourgogne (Programme Jeune Chercheur Entrepreneur; Grant 20100112095254682-1)”. The authors thank Messrs Chevalier, Frochot, Ferrand, Déquéant and

286 Besson for providing the samples. The authors thank Marie-Lara Bouffaud, Stéphane De Mita
287 and Fabien Halkett for providing constructive advices and helpful discussions. The authors also
288 thank the strategic platform “GENTYANE” INRA, Ibisa 2009 and its group leader Mr Poncet.
289

Table 1: Origin of samples (country, locality and GPS coordinates), numbers of samples for each origin and ecotype indication

Country	Locality*	Latitude*	Longitude*	n	Ecotype
France	Ampus	N 43° 36' 26.193"	E 6° 22' 59.7"	5	<i>aestivum</i>
Spain	Grenada	N 37° 10' 35.3532"	W 3° 35' 52.5444"	9	<i>aestivum</i>
France	Vailly	N 48° 22' 9.9768"	E 4° 7' 45.6378"	3	<i>uncinatum</i>
France	Nyons	N 44° 21' 42.771"	E 5° 8' 24.522"	3	<i>aestivum</i>
Belgium	Aarlon	N 49° 40' 59.9982"	E 5° 49' 0.0006"	4	<i>uncinatum</i>
France	St Remy de Provence	N 43° 47' 19.1466"	E 4° 49' 52.8348"	2	<i>aestivum</i>
France	Jarnac	N 45° 40' 53.0004"	W 0° 10' 26.1006"	9	<i>uncinatum</i>
China	Beinjing	N 39° 54' 15.1704"	E 116° 24' 26.6868"	1	ND
France	Clemencey	N 47° 14' 48.3252"	E 4° 52' 56.4276"	4	<i>uncinatum</i>
France	Daix	N 47° 21' 6.192"	E 4° 59' 57.4542"	23	<i>uncinatum</i>
France	Saint-Pantaly-d'Excideuil	N 45° 18' 59.7708"	E 1° 0' 54.2514"	3	<i>aestivum</i>
France	Lauret	N 43° 49' 56.5248"	E 3° 53' 7.2918"	8	<i>aestivum</i>
United Kingdom	Bedford	N 52° 8' 9.5208"	W 0° 27' 59.9436"	9	<i>uncinatum</i>
Sweden	Roma	N 57° 30' 28.944"	E 18° 27' 1.116"	6	<i>uncinatum</i>
France	Grignan	N 44° 25' 10.203"	E 4° 54' 33.9978"	9	<i>aestivum</i>
Hungary	Debrecen	N 47° 31' 47.9064"	E 21° 38' 21.6852"	1	<i>uncinatum</i>
France	Chamboeuf	N 47° 13' 49.2126"	E 4° 54' 19.5084"	3	<i>uncinatum</i>
France	Gignac	N 45° 0' 16.3584"	E 1° 27' 29.595"	4	<i>aestivum</i>
Luxembourg	Rumelange	N 49° 27' 32.8788"	E 6° 1' 57.2982"	4	<i>uncinatum</i>
France	Maizières	N 48° 35' 1.665"	E 6° 3' 42.1488"	12	<i>uncinatum</i>
France	Montdoré	N 47° 55' 12.2628"	E 6° 4' 48.9"	4	<i>uncinatum</i>
Italy	Pavullo	N 44° 19' 57.0678"	E 10° 50' 9.9996"	1	<i>aestivum</i>
France	Billom	N 45° 43' 26.133"	E 3° 20' 20.3028"	6	<i>uncinatum</i>
Romania	Bucarest	N 44° 26' 15.7596"	E 26° 5' 50.5206"	1	<i>uncinatum</i>
Spain	Sevilla	N 37° 22' 57.504"	W 5° 59' 46.6614"	4	<i>aestivum</i>
Sicilia	Palermo	N 38° 6' 56.3034"	E 13° 21' 41.0616"	2	<i>aestivum</i>
Spain	Soria	N 41° 45' 48.9528"	W 2° 27' 53.715"	5	<i>aestivum</i>
Switzerland	Lauzanne	N 46° 31' 11.8626"	E 6° 38' 0.9486"	2	<i>uncinatum</i>
France	Tarsul	N 47° 31' 57.6336"	E 4° 59' 3.4506"	11	<i>uncinatum</i>
France	Val Suzon	N 47° 24' 36.5322"	E 4° 53' 55.8018"	8	<i>uncinatum</i>
France	Richerenches	N 44° 21' 35.0382"	E 4° 54' 40.8882"	5	<i>aestivum</i>
France	Veuvey-sur-Ouche	N 47° 11' 8.5956"	E 4° 42' 55.2594"	2	<i>uncinatum</i>
France	Dye	N 47° 53' 58.1886"	E 3° 52' 9.4368"	1	<i>uncinatum</i>

* Due to the confidentiality between authors and truffle providers, only GPS coordinates of the closest town or village are indicated instead of the precise location.

ND = GPS coordinates not determined

301 **Table 2:** Allele frequencies over all samples for each locus (in bold, majority allele for each SSR marker)

<i>Locus</i> <i>aest1</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest6</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest7</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest10</i>	Allele	Allele frequency
Na= 9	236	0.48	Na= 7	206	0.01	Na= 8	256	0.28	Na= 8	280	0.17
	242	0.08		212	0.25		261	0.32		290	0.24
	248	0.11		218	0.49		266	0.11		295	0.26
	254	0.05		224	0.07		271	0.05		300	0.01
	260	0.22		230	0.06		276	0.16		305	0.17
	266	0.04		236	0.11		281	0.03		310	0.14
	272	0.01		248	0.01		286	0.05		315	0.01
	296	0.01					306	0.01		320	0.01
	302	0.01									
<i>Locus</i> <i>aest15</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest18</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest24</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest25</i>	Allele	Allele frequency
Na= 5	297	0.09	Na= 6	132	0.01	Na= 9	289	0.01	Na= 6	122	0.13
	312	0.62		136	0.13		292	0.10		125	0.01
	317	0.15		140	0.07		295	0.27		128	0.41
	322	0.13		144	0.54		298	0.32		131	0.17
	327	0.01		148	0.03		301	0.07		137	0.20
				156	0.21		304	0.07		140	0.08
							313	0.06			
							316	0.07			
							319	0.03			
<i>Locus</i> <i>aest26</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest27</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest29</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest31</i>	Allele	Allele frequency
Na= 11	124	0.16	Na= 9	311	0.01	Na= 8	186	0.14	Na= 10	280	0.01
	127	0.01		314	0.10		196	0.02		285	0.02
	139	0.11		317	0.24		201	0.05		290	0.07
	142	0.19		320	0.37		206	0.19		295	0.05
	145	0.05		323	0.03		211	0.17		300	0.07
	148	0.01		326	0.09		216	0.31		305	0.10
	151	0.01		335	0.06		221	0.10		310	0.25
	154	0.04		338	0.07		226	0.01		315	0.32
	157	0.33		341	0.03					320	0.09
	160	0.01								325	0.02
	178	0.08									
<i>Locus</i> <i>aest28</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest35</i>	Allele	Allele frequency	<i>Locus</i> <i>aest36</i>	Allele	Allele frequency			
Na= 21	260	0.01	Na= 5	124	0.02	Na= 10	310	0.01			
	344	0.07		144	0.63		318	0.01			
	347	0.02		148	0.14		322	0.24			
	353	0.17		152	0.05		326	0.46			
	356	0.14		160	0.16		330	0.04			
	359	0.22					334	0.05			
	365	0.05					338	0.05			
	368	0.01					342	0.01			
	371	0.01					346	0.13			
	374	0.02					350	0.01			
	377	0.14									
	380	0.01									
	383	0.01									
	389	0.03									
	392	0.02									
	395	0.01									
	398	0.01									
	401	0.02									
	437	0.01									
	449	0.01									
	452	0.01									

Table 3: Genotyping of the 15 microsatellites for the four different clusters. For each microsatellite the number of alleles (N_a), the number of effective alleles (N_e) and the expected heterozygosity (H_e) are indicated. For each cluster the sample size is shown in *italic*.

Cluster	Indices	aest1	aest6	aest7	aest10	aest15	aest18	aest24	aest25	aest26	aest27	aest28	aest29	aest31	aest35	aest36	All loci	
																	Mean	SE
Cluster1 <i>N=27</i>	Na	3	2	3	4	3	3	4	2	3	4	4	4	5	1	3	3.20	0.26
	Ne	1.58	1.93	1.16	1.60	1.46	1.67	3.21	1.53	1.16	3.21	1.94	2.13	2.98	1.00	1.85	1.89	0.18
	h	0.37	0.48	0.14	0.38	0.31	0.40	0.69	0.35	0.14	0.69	0.49	0.53	0.66	0.00	0.46	0.41	0.05
Cluster2 <i>N=22</i>	Na	4	5	2	4	2	3	3	2	5	4	11	3	6	2	4	4.00	0.59
	Ne	2.69	2.75	1.31	2.00	1.10	1.72	2.14	1.86	1.48	2.22	6.91	2.14	2.03	1.10	1.62	2.20	0.36
	h	0.63	0.64	0.24	0.50	0.09	0.42	0.53	0.46	0.32	0.55	0.86	0.53	0.51	0.09	0.38	0.45	0.05
Cluster3 <i>N=29</i>	Na	6	2	7	3	3	3	5	2	3	4	5	5	4	3	8	4.20	0.46
	Ne	1.99	1.40	4.50	1.32	2.10	1.32	1.82	1.07	1.32	1.43	3.10	2.36	2.99	1.96	4.86	2.24	0.30
	h	0.50	0.29	0.78	0.24	0.52	0.24	0.45	0.07	0.24	0.30	0.68	0.58	0.67	0.49	0.79	0.46	0.06
Cluster4 <i>N=96</i>	Na	5	5	3	3	2	5	5	3	9	6	10	5	7	3	2	4.87	0.62
	Ne	2.51	1.86	2.04	2.94	1.02	1.83	2.75	1.65	4.98	2.26	4.27	2.75	2.98	1.11	1.90	2.46	0.28
	h	0.60	0.46	0.51	0.66	0.02	0.45	0.64	0.40	0.80	0.56	0.77	0.64	0.66	0.10	0.47	0.52	0.06
All	Na Mean	4.50	3.50	3.75	3.50	2.50	3.50	4.25	2.25	5.00	4.50	7.50	4.25	5.50	2.25	4.25	4.07	
	SE	0.65	0.87	1.11	0.29	0.29	0.50	0.48	0.25	1.41	0.50	1.76	0.48	0.65	0.48	1.31	0.26	
	Ne Mean	2.19	1.99	2.25	1.97	1.42	1.63	2.48	1.53	2.23	2.28	4.06	2.34	2.75	1.29	2.56	2.20	
	SE	0.25	0.28	0.77	0.35	0.25	0.11	0.31	0.17	0.92	0.36	1.06	0.15	0.24	0.22	0.77	0.14	
	h Mean	0.52	0.47	0.42	0.45	0.24	0.38	0.58	0.32	0.38	0.52	0.70	0.57	0.63	0.17	0.53	0.46	
	SE	0.06	0.07	0.14	0.09	0.11	0.05	0.05	0.09	0.15	0.08	0.08	0.02	0.04	0.11	0.09	0.03	

Table 4: Genetic differentiation (Fst values) between pairs of clusters

Cluster	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Cluster 1		0.44	0.53	0.48
Cluster 2	0.44		0.51	0.43
Cluster 3	0.53	0.51		0.39
Cluster 4	0.48	0.43	0.39	



Figure 1: Number of samples per location and geographical position

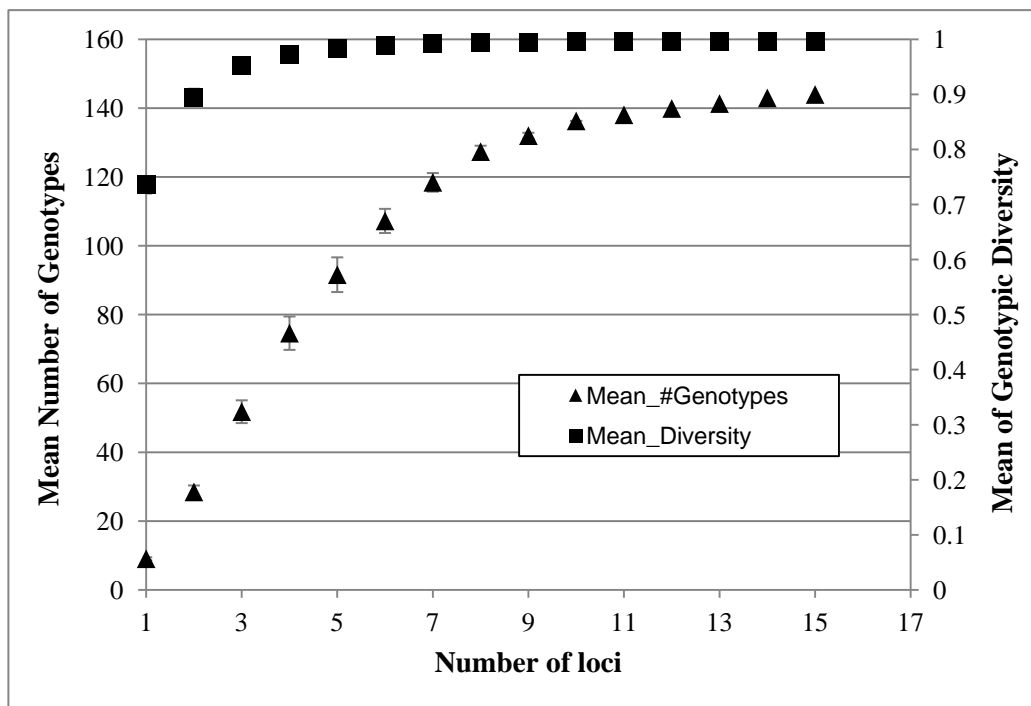


Figure 2: Plots of the mean number of genotypes and genotypic diversity versus the number of loci.

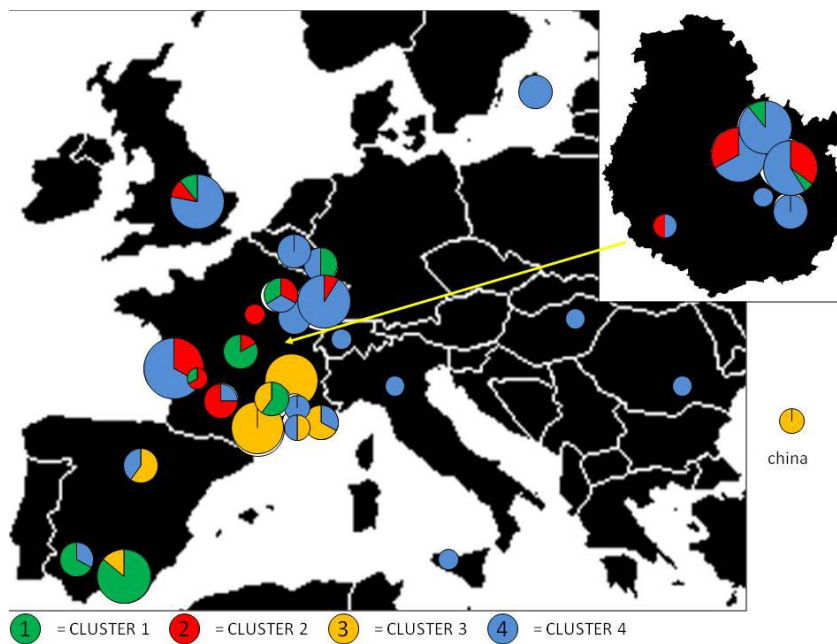


Figure 3: Map of probability (>0.7). For each potential cluster, there are some probabilities to define if individuals are likely in that population or not.

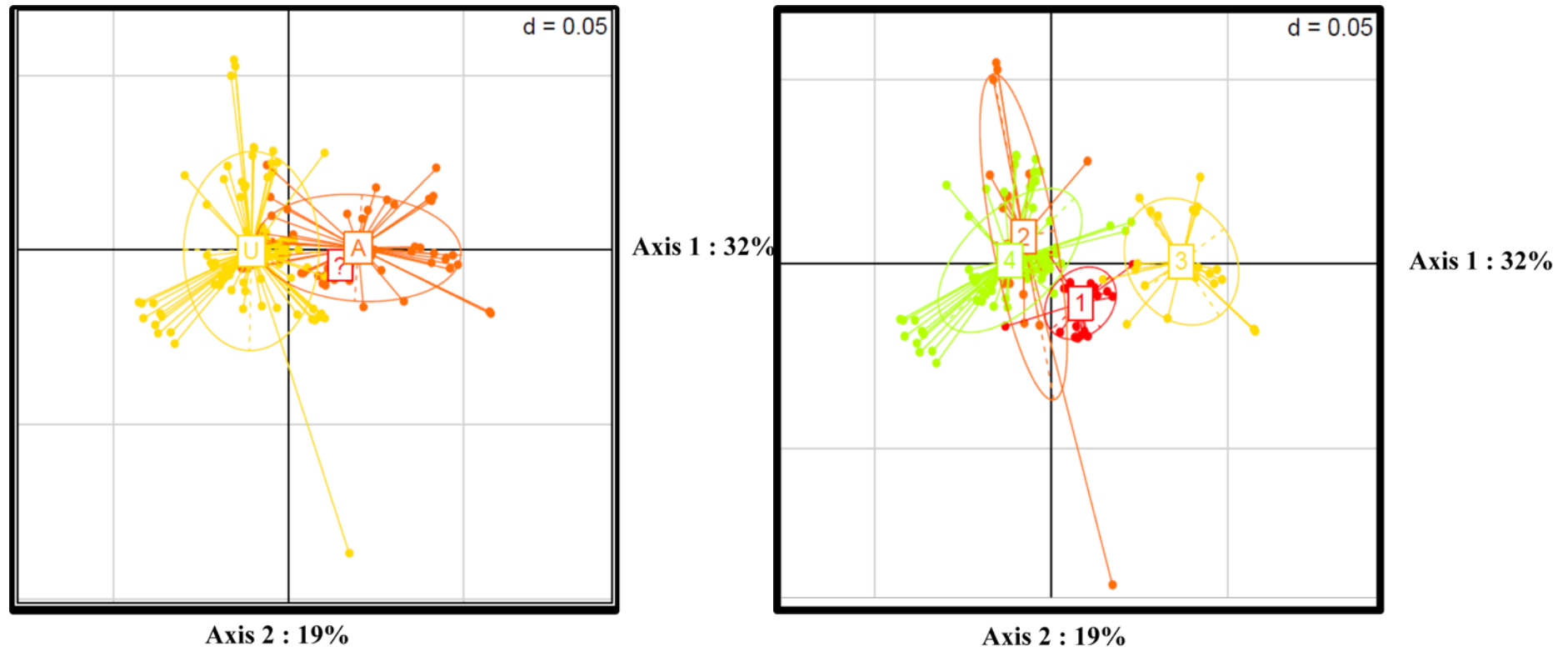


Figure 6: Plots of correspondence analyses showing ecotype membership (left) and cluster membership (right).

References

- Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1 (1-2):101-102. doi:10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x
- Bertault G, Roussett F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M (2001) Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86:451-458. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00855.x
- Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development* 3 (6):939-943
- Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C (2003) Le specie Europee del genere *Tuber*, una revisione storica. . Museo Regionale di Scienze Naturali, Monographie XXXVII. , Regione Piemonte, Torino.
- Chatin A (1887) Une nouvelle espèce de truffe. *Les comptes rendus de l'académie des sciences* 104:1132-1135
- Chevalier G, Desmas C, Frochot H, Rioussat L (1979) L' espèce *Tuber aestivum* Vitt. : I. Définition. *Mushroom Science X* (Part 1) 957-975
- Chevalier G, Frochot H (2002) La truffe de Bourgogne. Editions Pétrarque, Levallois-Perret, France
- Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selosse MA (2011) Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biol* 115 (7):569-597. doi:10.1016/j.funbio.2011.03.005
- Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22 (4):1-20
- Dupré C, Chevalier G, Branlard G Caractérisation des *Tuber* par électrophorèse de leurs protéines. In: C.R. 1er Colloque national sur les technologies de purification des protéines, Paris, 1985. DPIC-INPL, pp 465-467
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barres B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T (2007) Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44 (10):933-949. doi:10.1016/j.fgb.2007.05.003
- Ellegren H (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5 (6):435-445. doi:10.1038/nrg1348
- Gandeboeuf D, Dupré C, Chevalier G (1994) Use of isoenzyme analysis to differentiate truffles from Europe. *Acta Botanica Gallica* 141:455-463.
- Giraud T, Refregier G, LeGac M, deVienne DM, Hood ME (2008) Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 45:791-802
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Leger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11 (4):591-611. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x
- Guillot G (2008) Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation- the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* 24 (19):2222-2228. doi:10.1093/bioinformatics/btn419
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170 (3):1261-1280. doi:10.1534/genetics.104.033803
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005b) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5 (3):712-715. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x
- Jeandroz S, Murat C, Wang YJ, Bonfante P, Le Tacon F (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the 'true truffles'. *Journal of Biogeography* 35 (5):815-829. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01851.x
- Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD (2010) What Is a Microsatellite: A Computational and Experimental Definition Based upon Repeat Mutational Behavior at A/T and GT/AC Repeats. *Genome Biology and Evolution* 2:620-635. doi:10.1093/gbe/evq046
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species*. . Columbia University Press, New York.

- Mello A, Cantisani A, Vizzini A, Bonfante P (2002) Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environmental Microbiology* 4 (10):584-594
- Molinier V, Murat C, Morin E, Gollotte A, Wipf D, Martin F (2013) First Identification of Polymorphic Microsatellite Markers in the Burgundy Truffle, *Tuber aestivum* (Tuberaceae). *Applications in Plant Sciences* 1 (2):1200220. doi:10.3732/apps.1200220
- Mouches C, Duthil P, Poitou N, Delmas J, Bove J (1981) Caractérisation des espèces truffières par analyse de leurs protéines en gels de polyacrylamide et application de ces techniques à la taxonomie des champignons. *Mushroom Science* 11:819–831
- Murat C, Riccioni C, Belfiori B, Cichocki N, Labbe J, Morin E, Tisserant E, Paolocci F, Rubini A, Martin F (2011) Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* 48 (6):592-601. doi:10.1016/j.fgb.2010.10.007
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12):3321-3323. doi:10.1073/pnas.70.12.3321
- Pacioni G, Frizzi G, Miranda M, Visca C (1993) Genetics of a *Tuber aestivum* population (Ascomycotina, Tubérales). *Mycotaxon* 47:93-100
- Pacioni G, Pomponi G (1991) Genotypic patterns of some italian populations of the *Tuber aestivum-Tuber mesentericum* complex. *Mycotaxon* 42:171-179
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Topini F, Arcioni S (2004) *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? *Fems Microbiology Letters* 235 (1):109-115
- Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) : Population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86 (3):248-249
- Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolocci F (2008) *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist* 180 (2):466-478
- Roux C, Sejalón-Delmas N, Martins M, Parguey-Leduc A, Dargent R, Becard G (1999) Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *Fems Microbiology Letters* 180 (2):147-155
- Rubini A, Topini F, Riccioni C, Paolocci F, Arcioni S (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Molecular Ecology Notes* 4 (1):116-118. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00587.x
- Schlötterer C, Pemberton J (1998) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations—a critical review. In: Schierwater Da (ed) *Molecular approaches to ecology and evolution*. Basel, Switzerland., pp 71–86
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9 (5):615-629. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
- Song MS, Cao JZ, Yao YJ (2005) Occurrence of *Tuber aestivum* in China. *Mycotaxon* 91:75-80
- Stenberg P, Lundmark M, Saura A (2003) MLGsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Molecular Ecology Notes* 3 (2):329-331. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00408.x
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31 (1):21-32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Thioulouse J, Chessel D, Doledec S, Olivier JM (1997) ADE-4: A multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7 (1):75-83. doi:10.1023/a:1018513530268
- Thioulouse J, Dray S (2007) Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* 22 (5):1-14
- Turesson G (1922) The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas* 3:211-350
- Urbanelli S, Sallicandro P, De Vito E, Bullini L, Biocca E (1998) Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. *Mycologia* 90 (3):537-546
- Vincenot L, Nara K, Sthultz C, Labbe J, Dubois MP, Tedersoo L, Martin F, Selosse MA (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete

- Laccaria amethystina complex. Molecular Ecology 21 (2):281-299. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x
- Vittadini C (1831) Monographia tuberacearum. Rusconi, Milan
- Weden C, Danell E, Tibell L (2005) Species recognition in the truffle genus Tuber - the synonyms Tuber aestivum and Tuber uncinatum. Environmental Microbiology 7 (10):1535-1546. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00837.x

Table S1: Probability of multilocus genotypes (PGen) and probability that they occur resulting from distinct sexual events (PSex) for all samples harvested.

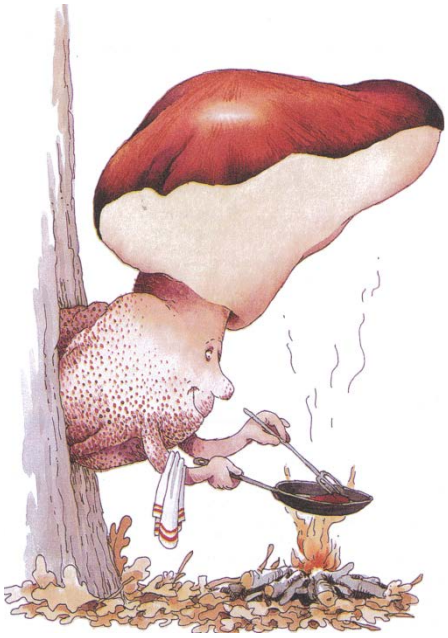
*** PValue(0.01) 1 significance level 0
 ** PValue(0.05) 1 significance level 0
 * PValue(0.10) 1 significance level 0

Multilocus genotypes (MLG)	Number of ramets	PSex	Significance	Level	PGen
MLG1	1	-	-	-	6.11537e-012
MLG2	1	-	-	-	9.57167e-009
MLG3	1	-	-	-	3.96819e-013
MLG4	1	-	-	-	1.97922e-010
MLG5	1	-	-	-	3.6088e-009
MLG6	1	-	-	-	1.7756e-008
MLG7	3	0	0	***	9.65236e-009
MLG8	1	-	-	-	2.13639e-008
MLG9	4	0	0	***	3.10553e-008
MLG10	1	-	-	-	4.28349e-009
MLG11	1	-	-	-	2.88607e-009
MLG12	2	0	0	***	8.11441e-012
MLG13	1	-	-	-	2.07207e-009
MLG14	2	2.38244e-010	0	***	1.25817e-007
MLG15	1	-	-	-	4.15645e-008
MLG16	1	-	-	-	2.19208e-008
MLG17	1	-	-	-	1.24078e-018
MLG18	1	-	-	-	7.50557e-009
MLG19	1	-	-	-	6.18369e-009
MLG20	2	0	0	***	1.57186e-010
MLG21	1	-	-	-	2.01459e-012
MLG22	1	-	-	-	1.57862e-012
MLG23	1	-	-	-	6.18521e-011
MLG24	1	-	-	-	5.25098e-009
MLG25	1	-	-	-	1.23979e-009
MLG26	1	-	-	-	2.09754e-012
MLG27	1	-	-	-	5.87017e-010
MLG28	1	-	-	-	2.40407e-010
MLG29	2	5.88418e-015	0	***	3.35451e-011
MLG30	1	-	-	-	4.59971e-013
MLG31	1	-	-	-	4.25497e-009

Multilocus genotypes (MLG)	Number of ramets	P _{Sex}	Significance	Level	P _{Gen}
MLG32	1	-	-	-	3.57889e-011
MLG33	1	-	-	-	2.33077e-008
MLG34	1	-	-	-	9.75424e-010
MLG35	1	-	-	-	3.02929e-009
MLG36	1	-	-	-	6.49133e-010
MLG37	1	-	-	-	7.77922e-009
MLG38	2	9.68114e-014	0	***	2.5217e-009
MLG39	1	-	-	-	3.86181e-010
MLG40	1	-	-	-	1.08653e-012
MLG41	1	-	-	-	4.08865e-009
MLG42	1	-	-	-	3.33184e-010
MLG43	1	-	-	-	7.13966e-011
MLG44	1	-	-	-	2.13824e-008
MLG45	2	1.92013e-010	0	***	1.12949e-007
MLG46	1	-	-	-	1.42653e-008
MLG47	1	-	-	-	1.0577e-007
MLG48	1	-	-	-	4.11474e-009
MLG49	1	-	-	-	1.00868e-010
MLG50	1	-	-	-	3.22014e-009
MLG51	1	-	-	-	3.36005e-008
MLG52	4	0	0	***	5.48233e-008
MLG53	1	-	-	-	2.32494e-008
MLG54	1	-	-	-	5.21047e-010
MLG55	1	-	-	-	4.85272e-010
MLG56	1	-	-	-	4.39073e-010
MLG57	1	-	-	-	1.74776e-008
MLG58	2	4.78506e-014	0	***	1.69447e-009
MLG59	1	-	-	-	7.47837e-008
MLG60	1	-	-	-	1.37092e-008
MLG61	3	3.44169e-015	0	***	3.80092e-009
MLG62	1	-	-	-	1.20189e-014
MLG63	1	-	-	-	2.49435e-010
MLG64	1	-	-	-	2.17395e-009
MLG65	1	-	-	-	2.36307e-009
MLG66	1	-	-	-	6.15302e-009
MLG67	1	-	-	-	3.62705e-008
MLG68	3	2.39808e-014	0	***	3.17042e-007
MLG69	1	-	-	-	9.44699e-009

Multilocus genotypes (MLG)	Number of ramets	P _{Sex}	Significance	Level	P _{Gen}
MLG70	1	-	-	-	7.67754e-009
MLG71	1	-	-	-	5.29076e-010
MLG72	1	-	-	-	6.1635e-009
MLG73	1	-	-	-	5.64004e-010
MLG74	2	5.06151e-013	0	***	5.81603e-009
MLG75	1	-	-	-	7.88461e-011
MLG76	1	-	-	-	2.65064e-011
MLG77	1	-	-	-	1.21986e-012
MLG78	1	-	-	-	2.29893e-012
MLG79	5	8.65974e-015	0	***	1.2474e-013
MLG80	2	2.33147e-015	0	***	2.69437e-013
MLG81	1	-	-	-	2.91944e-014
MLG82	1	-	-	-	1.67154e-012
MLG83	1	-	-	-	1.51951e-011
MLG84	1	-	-	-	2.92214e-011
MLG85	1	-	-	-	2.34493e-015
MLG86	1	-	-	-	8.4603e-015
MLG87	1	-	-	-	8.00412e-012
MLG88	1	-	-	-	1.2314e-012
MLG89	1	-	-	-	2.50481e-014
MLG90	1	-	-	-	1.45516e-013
MLG91	1	-	-	-	8.79563e-015
MLG92	1	-	-	-	4.51732e-013
MLG93	1	-	-	-	1.08698e-011
MLG94	1	-	-	-	3.60273e-012
MLG95	1	-	-	-	3.29248e-012
MLG96	1	-	-	-	1.93552e-015
MLG97	1	-	-	-	1.88781e-012
MLG98	1	-	-	-	8.69584e-012
MLG99	1	-	-	-	4.83764e-013
MLG100	1	-	-	-	1.67942e-012
MLG101	1	-	-	-	4.16497e-012
MLG102	1	-	-	-	5.56272e-013
MLG103	1	-	-	-	3.45141e-014
MLG104	1	-	-	-	1.09178e-013
MLG105	1	-	-	-	6.16403e-014
MLG106	1	-	-	-	7.86036e-012
MLG107	1	-	-	-	1.0631e-011

Multilocus genotypes (MLG)	Number of ramets	P _{Sex}	Significance	Level	P _{Gen}
MLG108	1	-	-	-	3.50667e-012
MLG109	2	6.10623e-015	0	***	5.64291e-013
MLG110	1	-	-	-	2.82146e-013
MLG111	1	-	-	-	2.13137e-012
MLG112	1	-	-	-	1.24827e-014
MLG113	1	-	-	-	2.22478e-014
MLG114	1	-	-	-	1.14557e-012
MLG115	1	-	-	-	7.96919e-012
MLG116	1	-	-	-	5.28464e-012
MLG117	1	-	-	-	4.51108e-011
MLG118	1	-	-	-	1.40971e-012
MLG119	1	-	-	-	1.69956e-012
MLG120	1	-	-	-	5.53446e-012
MLG121	1	-	-	-	1.04216e-013
MLG122	1	-	-	-	1.79243e-015
MLG123	1	-	-	-	1.5661e-014
MLG124	1	-	-	-	1.45202e-011
MLG125	1	-	-	-	7.55563e-013
MLG126	2	3.44169e-015	0	***	4.13761e-013
MLG127	2	0	0	***	5.29613e-013
MLG128	1	-	-	-	2.71597e-014
MLG129	1	-	-	-	9.43044e-015
MLG130	1	-	-	-	1.30771e-015
MLG131	2	8.43769e-015	0	***	3.14818e-014
MLG132	1	-	-	-	4.79769e-017
MLG133	1	-	-	-	1.51682e-013
MLG134	1	-	-	-	2.85133e-012
MLG135	1	-	-	-	3.47604e-014
MLG136	1	-	-	-	6.8072e-015
MLG137	1	-	-	-	3.19905e-012
MLG138	1	-	-	-	1.80589e-013
MLG139	1	-	-	-	4.35686e-015
MLG140	1	-	-	-	1.3163e-012
MLG141	1	-	-	-	6.73485e-014
MLG142	1	-	-	-	3.55e-014
MLG143	1	-	-	-	4.41392e-014
MLG144	2	8.32667e-015	0	***	2.97059e-014



Chapitre III :
Etude de la variabilité aromatique de
Tuber aestivum à l'échelle locale



Chapitre III : Etude de la variabilité aromatique de *Tuber aestivum* à l'échelle locale

Après avoir clarifié la position taxonomique de *Tuber aestivum*, et avoir étudié sa diversité génétique et son polymorphisme à grande échelle par une étude de génétique des populations, nous nous sommes intéressés, dans cette partie, à sa diversité aromatique. Des études précédentes ont pu mettre en évidence des centaines de composés organiques volatils présents dans les corps fructifères de *Tuber aestivum*. Comme pour les autres espèces du genre *Tuber*, on observe une variabilité des composés organiques volatils entre échantillons de cette espèce même s'ils ont été collectés dans une même truffière. De plus, il a été récemment démontré que le génotype était lié à la variabilité en composés C8. Enfin, la manière dont la variabilité aromatique se comporte à travers le temps pour *Tuber aestivum* reste obscure.

Dans ce chapitre, notre but était d'étudier la diversité aromatique de la truffe de Bourgogne à travers le temps à une échelle locale. Les principales questions posées étaient : i) existe-t-il une variabilité génétique et aromatique entre plusieurs saisons de récolte, ii) existe-t-il une différence génétique et aromatique entre un site dit « naturel » et un site issu d'une plantation et iii) existe-t-il des COV (autres que les composés C8) dont la concentration serait génotype-dépendante ?

Pour cela, 52 corps fructifères de *Tuber aestivum* ont été collectés au sein d'un site « naturel » et au sein d'un site issu d'une plantation sur deux saisons consécutives. Pour chacun des échantillons, le profil aromatique et le profil génétique ont été caractérisés, par SPME-GC/MS et par l'utilisation de marqueurs microsatellites respectivement.

Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence l'existence d'une différenciation modérée entre les individus issus d'une truffière naturelle et les individus issus d'une truffière plantée. De plus, pour la truffière plantée, les individus présentant les mêmes génotypes ont été collectés à quelques mètres d'écart. D'une saison de récolte à l'autre, une stabilité génotypique a été observée. Au niveau aromatique, seuls les composés C8 semblaient être liés aux génotypes.

Cette partie a été rédigée sous la forme d'un article de recherche (Article 5).

Article 5 : Genetic and aromatic diversity of Burgundy truffles in a natural and artificial truffle orchard

Auteurs:

Virginie Molinier¹, Claude Murat², Henri Frochot³, Daniel Wipf¹, Richard Splivallo^{4†}

¹ UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/u. Bourgogne, Pôle Interactions Plantes Microorganismes ERL 6300CNRS, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine « Interactions Arbres-Microorganismes », Labex ARBRE, FR EFABA, 54280 Champenoux, France.

³ 3 Rue de la Forge, 21120 Tarsul, France

⁴ Molecular Phytopathology and Mycotoxin Research, University of Goettingen, Grisebachstrasse 6, D-37077 Goettingen, Germany

† Author for correspondence: richard.splivallo@a3.epfl.ch

Abstract

Truffles are symbiotic fungi in high demand by food connoisseurs because of their intense aroma. Unlike culture intensive crops, truffle cultivation still relies on empirical rules which result in low and highly variable yields. A better knowledge about truffle genetics and product quality (aroma variability) will help improving yield and defining proper management rules for truffle orchards.

One aim here was to document the genetic diversity within a natural and an artificial truffle orchard over two consecutive seasons. A second aim was to investigate the structural diversity and genotypic dependence of all constituents of Burgundy truffles aroma. The third aim was to compare the aroma profiles of truffles collected in the natural orchard to those collected in the artificial one. A total of 52 Burgundy truffles were collected from one natural and one artificial truffle orchard over two consecutive seasons. Each truffle was characterized in terms of aroma profile (SPME-GC/MS) and genotype (SSR).

In terms of genetic diversity, a moderate differentiation was observed in the population of truffles collected in the natural orchard compared to the population originating from the man-made orchard. Within the artificial truffle orchard, fruiting bodies belonging to the same genotypes were generally collected a few meters apart, and on a few counts, the same genotype could be detected from one season to the next. Aroma constituents included alcohols, ketones, aldehydes and sulfur containing compounds. Only minor differences were detectable in terms of aroma constituents within the two orchards. With the exception of eight carbon containing volatiles, none of these volatiles were related to genotype.

Our results highlight a relative genetic stability over consecutive seasons in truffles originating from a single orchard and indicate that the aroma of Burgundy truffle is partially dependent on genetic background and partially on some yet unidentified factors.

26 Introduction

27 The mushroom industry represents a 25 billion market (US\$/year) made up of 92%
28 cultivated and 8% wild species (Boa, 2004). Cultivated species are dominated with saprophytic
29 mushrooms which can be easily induced to produce fruiting bodies (spore bearing organs) under
30 controlled conditions (i.e. the button mushroom *Agaricus bisporus* – 30% of the market volume,
31 the Asian Shiitake mushroom *Lentinula edodes* – 25%, and the oyster mushroom (various
32 *Pleurotus* species – 14%)). Much lower cultivation success has been achieved with symbiotic
33 (i.e. ectomycorrhizal) species (i.e. truffles, morels), most likely because of the complex and
34 poorly understood interactions of these fungi with their environment (i.e. host plant, soil,
35 climate) (Hall *et al.*, 2003).

36 Truffles belong to such ectomycorrhizal species and are currently harvested in the wild
37 and in man-made truffle orchards. In both wild and man-made plantations, truffles colonize short
38 roots of host plants (i.e. hazel, oaks) and form ectomycorrhizas. The difference between natural
39 versus man-made plantations is merely that in the first ectomycorrhizas are formed naturally
40 through i.e. truffle spores present in the soil, while in the second tree roots are inoculated in
41 nurseries prior to being planted in truffle orchards. Methods to obtain plant roots mycorrhized by
42 truffle fungi have been already established in the 60' and 70' (Chevalier and Grente 1973;
43 Chevalier *et al.* 1973; Fassi and Fontana 1967). So far obtaining truffles fruiting bodies through
44 man-made plantations has been partially successful for some (i.e. *T. borchii*, *T. mesentericum*, *T.*
45 *melanosporum*, *T. uncinatum* *syn.* *T. aestivum*) but not all (i.e. *T. magnatum*) truffle species. The
46 cultivation of truffles is indeed an ill defined practice which as of today still relies on empirical
47 rules. As a consequence the yield of truffles harvested from one season to the next can greatly
48 vary.

Because truffles are such an unconventional and difficult crop, breeding programs classically used to select for desired traits with extensively cultivated crops have to date not been implemented with truffles (i.e. selection for desirable aroma or size of fruiting bodies). Recently insights into the sexuality of the Périgord black truffle suggested that breeding might actually be used on the long term for truffles, since for that species ascomata formation is now known to be derived from sexual reproduction of individuals of opposite mating types (Martin et al. 2010). Efficient breeding programs however also require a fast generation time, which is not the case with truffles (fruiting bodies are typically obtained 4-10 years after establishing a truffle orchard).

Truffle aroma is responsible of the high demand of the fungus on the market. Truffle fruiting bodies emit hundreds of volatiles, a small fraction of which is responsible for what humans perceive as truffle aroma (“aroma active compounds”) (Culleré *et al.*, 2010; Splivallo *et al.*, 2011). Six aroma active compounds have been described for the Burgundy truffle collected in north-eastern Spain and included sulfur containing compounds, alcohols and ketones (Culleré *et al.*, 2010). The concentration of single constituents of truffle aroma greatly varies among fruiting bodies of the same species, even for truffles collected from the same orchard (Splivallo *et al.*, 2012). The causes of this variability has been linked with geographical region for *T. magnatum*, (Gioacchini *et al.*, 2008) and fruiting body maturation for *T. borchii* (Zeppa *et al.*, 2004), even though these factors might have minimal influence on Burgundy truffle’s aroma (Splivallo *et al.*, 2012). In the latter species, truffle genotype has been linked to variability in concentration of eight carbon-containing volatiles (C₈-VOC). 1-Octen-3-ol, a volatile with typical fungal aroma, is the major representative of C₈-VOC in truffles. Whether genotype influences other constituents of the Burgundy truffle aroma is not clear. Furthermore genetic

diversity of truffle fruiting bodies collected in natural and man-made orchards have been documented on a few counts for the Périgord truffle *T. melanosporum* (Rubini *et al.*, 2011; Linde & Selmes, 2012) and the Burgundy truffle (Splivallo *et al.*, 2012), but how this diversity changes over time remains to be investigated.

Our aims, here, were to document volatile and genetic diversity of Burgundy truffles over time. We did so by collecting fruiting body samples in artificial and natural truffle orchards over two consecutive seasons. The specific questions we wished to answer were: (i) Is there a drift in genotype within a truffle field from one season to the next? (ii) Are there other volatiles, besides C8-VOC, which concentration is genotype-dependent? (iii) Are there detectable differences in the aroma of truffles collected in the artificial and in the natural orchards?

Material and Methods

Truffle fruiting bodies collection and handling

Ascomata of *Tuber aestivum* were collected from two different locations in the Burgundy region (Daix and Tarsul) (Table 1). “Tarsul” truffle orchard is a natural orchard and in contrary, “Daix” truffle orchard is a cultivated truffle orchard with 98 hazelnut trees inoculated 30 years ago by *Tuber melanosporum* according to the inoculation process developed during the 1970’s (Chevalier 1983). After nine years of production, *Tuber aestivum* replaced *Tuber melanosporum* (Molinier et al in prep and pers. comm) Geographical distance between the two locations is around 21km. Samples were harvested during two different harvesting seasons: 2010 and 2011 during the autumn period. After harvesting, each sample was immediately frozen at -80°C. Truffle fruiting body maturity was determined from the formula [number of ascii containing melanized spores:total number of ascii] (Zeppa *et al.*, 2004; Splivallo *et al.*, 2012).

95 **Genotyping of truffles by SSR**

96 For genotyping step, one little part of each frozen samples was dried for an easier
97 handling. Each sample was then crushed using a sterilized scalpel. DNA was extracted using a
98 metabisulfite method. An extraction buffer (100mM Tris pH=8.0, 50mM EDTA, 5M NaCl,
99 20mM metabisulfite and 2% RNase (10mg/ml)) was added to the crushed truffles and tubes were
100 incubated at 95°C during 45min. Tubes were centrifuged during 10 minutes at 4000g at 4°C.
101 Supernatant is put in a new tube containing a mix Isopropanol/ammonium acetate (7.5M)
102 (400/25, vol/vol) and tubes were homogenized by inversion. Tubes were centrifuged during 30
103 minutes at 4000g at 4°C. Supernatant was discarded and pellet was kept and washed by Ethanol
104 70%. After drying, pellet was resuspended in 100µL TE 0.1X. DNA concentration was estimated
105 using PicoGreen® and all DNA extracts were homogenized at 10ng/ml. Ten polymorphic
106 microsatellite loci were chosen. Markers used were aest6, aest10, aest18, aest25, aest26, aest27,
107 aest29, aest31, aest35 and aest36 (Molinier et al. 2013) () Microsatellite polymerase chain
108 reactions (PCR) were performed in a 10 µL volume containing 2.5µl at 10ng/ml of DNA of *T.*
109 *aestivum*, 5 µL of AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (AB-life technologies), 0.5 µL primer mix
110 fluorescently labelled forward primer with either 6-FAM, VIC (Eurofins MWG Operon)
111 fluorescent dyes and 2µL sterile water. PCR was performed in a thermocycler Veriti 384 Well
112 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) under the following conditions: the PCR
113 started with a cycle of 10 min at 95°C, followed by 7 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 62°C and 30
114 s at 72°C. Then the PCR continued with 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C
115 and after 8 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 56°C and 30 s at 72°C, and finished with an elongation
116 cycle of 5 min at 72°C. PCR products were assayed on an ABI 3730XL sequencer (Applied
117 Biosystems, Foster City, California, USA) using 500 liz as a size standard (and after adding

deionized formamide) at the “Plateforme de Génotypage GENTYANE” (Clermont-Ferrand, France). Fragment sizes were analyzed with GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems).

Gene diversity and expected heterozygosity (H) among populations were calculated with MLGsim software (Stenberg et al. 2003). The expected heterozygosity is a measure of the probability that two copies of the same gene chosen randomly in a population will have different alleles (Nei 1973). This is based on the allele frequency and can be calculated as : $H = 1 - \sum p_i^2$. GENALEX software (Peakall and Smouse 2006) was used to build a pairwise genetic distance matrix for all samples. This matrix was imported under MEGA (Tamura et al. 2011) to perform a Neighbour-joining analysis and to construct a neighbour-joining tree. Genetic differentiation between populations (Daix/Tarsul and Daix2010/Daix2011) was inferred thank to the fixation indices (F_{st}) between populations using SPAGEDI version 1.2 (Hardy and Vekemans 2002) A high F_{st} implies a considerable degree of differentiation among populations. The negative F_{st} values, likely reflecting the imprecision of the algorithm used by the software, were replaced by null values.

Volatile compound analysis by SPME-GC/MS

Volatiles from 300 ± 2 mg truffle (gleba or peridium) sample were extracted by SPME and analyzed by GC/MS as described earlier allowing to quantitatively compare the concentration of single volatile components among many samples (Splivallo *et al.*, 2012). In contrast to the chromatographic fingerprinting method used earlier which did not always allow to separate single volatiles (Splivallo *et al.*, 2012), the GC method was modified here to resolve as

many single components as possible (Initial oven temperature: 40°C, followed by a ramp at 2°C min⁻¹ to 72°C; then a ramp at 80°C min⁻¹ to 250°C (hold 5.77 min) - total run time: 26.00 min).

VOC data processing and statistics

Chromatograms were processed using TagFinder (Luedemann *et al.*, 2008). TagFinder allows a non-biased handling of chromatographic data and generates a data matrix for all samples which consists of TAGs (in our case one TAG corresponds to the intensity of a specific mass within a specific retention time window). TAGs for major volatiles (defined as occurring in at least 35 % of all samples) were assigned to known substances after the injection of authentic standards.

Statistics were performed on the data matrix to identify TAGs which significantly differed between samples of different location (i.e. Daix versus Tarsul) or different tissues (peridium vs gleba). Parametric or non parametric tests were used depending on data normality. The specific tests used are described in the result section.

For analyzing the effect of maturity on volatile profiles, samples were grouped in three maturity categories (0-30% for immature truffles, 31-70% for mature truffles and 71-100% for fully mature truffles).

Results

Genetic diversity

Genotyping was performed on 39 truffles. As expected, due to the haploid nature of the ascocarp (Paolocci *et al.*, 2006), each locus gave only one peak. The number of different alleles per *locus* varied from 3 to 7 (Table1). The average numbers of different alleles over loci (N_a) for Daix population and Tarsul population are 4.4 (SE= 0.340) and 3.1 (SE=0.314) respectively. The

average numbers of effective alleles over loci (N_e) for Daix population and Tarsul population are 2.719 (SE=0.208) and 2.096 (SE=0.292) respectively. The average expected heterozygosities over loci (H) for Daix population and Tarsul population are 0.604 (SE=0.043) and 0.445 (SE=0.065) respectively (Table 2). H average values are significantly different between Daix and Tarsul populations. F_{st} value all loci mixed between Daix and Tarsul population is 0.1394 (p-value = 0.0027). It means that these two populations are significantly moderately differentiated (Table3). By cons, F_{st} value between Daix 2010 and Daix 2011 populations is 0.0242 (p-value = 0.3869). It means that it is not possible to affirm that these two populations are differentiated (Table 4). We note that either for comparison Daix/Tarsul (i.e artificial/ natural) or for comparison Daix2010/Daix2011, for each case, some SSR markers seem to be more discriminating. Indeed, for the comparison of Daix/Tarsul, aest36, aest35, aest31 and aest6 seem to be more discriminating with 0.6507 (p-value=0), 0.148 (p-value=0.064), 0.1494 (p-value=0.0804) and 0.1245 (p-value=0.0658) as F_{st} values respectively (Table 3). In contrast, other SSR markers are very close to 0 for F_{st} values. For season comparison, no SSR markers are discriminating (Table 4).

Distribution of truffle genotypes over two seasons

The genetic relationship among truffles collected in the natural and artificial truffle orchards was assessed by neighbour joining analysis (Fig. 1). Genotypes were defined for bootstrap values >70% (n= 1000 permutations). Over the two consecutive sampling periods of this study, a total of ten genotypes could be identified in both orchards (genotypes I to X in Fig. 1) representing 69% of all samples (31% were unclassified). Five genotypes were specific to the artificial truffle orchard (genotypes I, II, III, VI and IX), three genotypes to the natural orchard

(IV, V, VII), while two occurred in both (VI and X) (Fig. 1). Truffles belonging to genotypes I and III were dominant in the artificial truffle field (five truffles were collected for each genotype). Truffles belonging to the latter two genotypes were furthermore collected in both sampling seasons (2010 and 2011).

Major volatiles of Burgundy truffle

A structure could be assigned for 81% of the major (occurring in $\geq 35\%$ of all samples) tags. Volatiles of Burgundy truffles contained alcohols, aldehydes, esters and ketones functional groups. Especially diversified were eight-carbon containing volatiles for which six structures could be identified (see legend of Fig. 2). The concentration of major volatiles varied greatly from one sample to another as illustrated in the heatmap represented in Fig. 2.

Influence of truffle maturity and tissue specificity on volatile profiles

No qualitative difference in terms of single constituents was detected among truffles of different maturity (classified as fully mature = 71-100%, mature 31-70% and immature 0-30% - data not shown). Quantitative differences were detected for 2-butanone which seemed to be present in lower concentrations in immature truffles ($n=6$, normalized average tag intensity (\pm SE): 0.24 ± 0.09) compared to other maturity classes ($n=5$ for mature truffles (0.75 ± 0.07) and $n=38$ for fully mature truffles (0.65 ± 0.05) ($p = 0.025$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 3).

A total of eleven truffles were used to compare the volatile profiles emitted from different parts of truffle ascomata (gleba and peridium). On one side, qualitative and quantitative differences occurred in the volatiles produced by the gleba and the peridium of the same truffle sample (Fig. 4). These differences were nevertheless inconsistent among samples, and not a single marker

consistently occurring in one sample type but not the other (peridium or gleba) was detected (Fig. 4). Quantitative differences between gleba and peridium were, on the other side, detectable for benzaldehyde and 2- and 3-methyl-1-butanol, which were present in higher concentrations in the peridium compared to the gleba (Fig. 5).

Comparing volatile profiles of truffles from the natural and the artificial orchards

Not a single volatile marker specific of truffles collected from one of the orchards could be identified. A quantitative difference was nevertheless detected for a single volatile, 1-methoxy-3-methylbenzene, which was present at significant higher concentrations in the samples collected from the artificial truffle orchard (normalized tag intensity \pm SE: 0.252 ± 0.119) compared to the natural one (0.013 ± 0.010) ($p = 0.028$, Mann-Whitney U test).

Comparing volatile profiles of different truffle genotypes

As already described, ten truffle genotypes were detected in the artificial and natural orchards (Fig. 1). Major Burgundy truffle volatiles are shown in a heatmap reflecting their concentration along with the samples genotypes in Fig. 6 (Fig. 7 illustrates the same heatmap but shows all volatiles). To be able to statistically assess the influence of genetic background on truffle aroma, only genotypes including a sufficient number of individuals were considered here. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the concentrations of all volatiles between genotypes I and III which included five individuals each (in the artificial orchard). Statistically, significant differences between genotypes were detected for tags which corresponded to the eight-carbon containing volatiles 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol and 3-octanol (Fig. 8). No

statistical differences between genotypes I and III were detectable for any other volatiles (Fig. 8 for major volatiles, data not shown for minor volatiles).

Distribution of the genotypes and C8-volatiles in the truffle field

Within the artificial truffle orchard, truffle ascomata belonging to the same genotype were generally collected in close vicinity from each other except for genotype I (full black dots in Fig. 9) for which samples were spread over the lower half of the truffle orchard. Bubble plots overlaid on the map of the truffle orchard highlight that high concentrations in three C8-VOCs co-localize with genotype III. In the contrary, no co-localization pattern between genotype and concentrations of dimethylsulfide was detectable (Fig. 9).

Discussion

In the present work, we compared the genetic and aromatic diversity of Burgundy truffles collected over two consecutive seasons from an artificial and a natural truffle orchard in eastern France. Understanding truffle population structure and dynamics within single orchards might improve management practices and result in higher ascomata yield. Linking genetic to aromatic diversity might similarly result in better consumer acceptance of truffle products.

Population structure and diversity studies have been conducted for *T. melanosporum* (Murat *et al.*, 2004, 2011; Rubini *et al.*, 2011; Linde & Selmes, 2012), *T. magnatum* (Mello *et al.*, 2005) (Rubini *et al.* 2005) and *T. aestivum* (syn. *T. uncinatum*) (Mello *et al.*, 2002; Weden *et al.*, 2004; Paolocci *et al.*, 2004; Splivallo *et al.*, 2012).

A genetic population study has shown that populations of *Tuber melanosporum* would have followed post-glacial recolonization routes and would be very differentiated between them (Murat et al. 2004). Moreover a correlation between geographic distance and genetic distance was found. Same post-glacial conolization pattern was demonstrated for *Tuber magnatum* (Rubini et al. 2005). Concerning the last one, *Tuber aestivum*, up to now, no genetic structure study was performed to infer polymorphism and genetic diversity at large-scale or within its repartition area.

To the best of our knowledge, seasonal variability of population structure in terms of truffle fruiting bodies has not yet been addressed. By collecting Burgundy truffles in two consecutive seasons from an artificial and a natural truffle orchard, we could illustrate a moderate yet significant genetic differentiation in samples collected between the two orchards (Tables 1, 3). Truffles collected in the two seasons from the artificial truffle orchard were genetically similar (Table 4) indicating that no major genetic drift occurred from one season to the next. A similar inference can be drawn from the genotypic data since truffles belonging to the same genotypes were harvested in the two consecutive seasons in the artificial truffle field (Fig. 1). An equivalent observation was made recently for Burgundy truffles collected in an artificial truffle orchard in Switzerland and genotyped with a different technique (AFLP) (Splivallo *et al.*, 2012). Taken together, these findings indicate that a certain genetic stability exists in the population of truffles which form fruiting bodies from one season to the next. In light of the recently described sexuality of the Périgord truffle (Rubini *et al.*, 2011), this also suggests that truffle genotypes which colonize the roots of host plants and which make up the largest part of truffle fruiting bodies biomass are persistent over two consecutive seasons. These observations, however, only provide a spot-light view of truffle dynamics in an orchard. They do not imply

that competition to colonize plant roots does not occur among truffle genotypes. Clearly, genotyping of mycorrhizas, of soil samples and of a large number of truffle ascomatas collected over many years will be needed to properly address how dynamic truffle fungi are belowground.

The genotype of Burgundy truffles was linked in an earlier report to the concentration of eight carbon containing volatiles (Splivallo *et al.*, 2012). We investigated here if such a genotypic dependence could be documented for other volatiles emitted by Burgundy truffles. Interestingly, this was not the case for any of the volatiles identified in this study (Fig. 3). Only three C8-VOC were linked to genotype (1-octen-3-ol, 1-octen-3-one and 3-octanol). Concentrations of these three volatiles have been reported to increase in truffles upon freezing (Culleré *et al.*, 2013). Freezing, however, does not explain the differences among genotypes observed in our data, since all samples were frozen at the same time and for the same period of time prior to analysis of the volatiles. Freezing might however lead to the *de novo* formation of volatiles by disrupting tissues and allowing enzymes to work on specific substrates. Hence, demonstrating if distinct genotypes actually differ in C8-VOCs or in the concentrations of their precursors will require working with fresh samples.

Other factors than genotype have been reported to influence truffle aroma. For white truffles, these include maturation (Zeppa *et al.*, 2004) and geographical origin (Gioacchini *et al.*, 2008). An earlier report based on a low resolution fingerprinting of volatiles concluded that the latter factors had no influence on the aroma of Burgundy truffles (Splivallo *et al.*, 2012). We wanted here to address these arguments again by using a volatile fingerprinting technique which allowed an adequate resolution to distinguish single volatile constituents of Burgundy truffle aroma. Interestingly, only quantitative differences in a single volatile (2-butanone) could be linked to truffle maturation. This is essentially different from the whitish truffle *T. borchii* for

which numerous volatiles seem maturity-dependent and for which major qualitative differences among maturity stages seem to exist (Zeppa *et al.*, 2004). Qualitative differences in aroma profiles have also been documented for Piedmont truffles (*T. magnatum*) collected in different geographical locations (i.e. the isoprenoid cedrol was detectable only in samples from Piedmont while another isoprenoid himachalene was occurring only in samples from Umbria) (Gioacchini *et al.*, 2008). Unlike in *T. magnatum*, only quantitative differences in the concentration of a single volatile (1-methoxy-3-methylbenzene) were detected among Burgundy truffles collected from the two sampling sites of this study.

Many reasons might explain why maturation and geographical origin only have a minor influence on Burgundy truffle aroma but seem to have a major influence on white truffle aroma. One possible explanation is that different truffles species behave similarly to vine cultivars which react differently to climatic and soil factors (Leeuwen *et al.*, 2004). Another possible explanation resides in sample preparation. In the present study, truffle samples were washed and frozen prior to analyzing volatiles. In the contrary, the studies on white truffles were performed with fresh samples, but it is not mentioned if the latter were washed or not (Zeppa *et al.*, 2004; Gioacchini *et al.*, 2008). Freezing and washing truffles will affect the microbial population within truffle fruiting bodies (Barbieri *et al.*, 2005, 2007; Splivallo *et al.*, 2011), possibly modifying their volatile profiles. How much the microbial population of truffle fruiting bodies contributes to aroma formation is actually unknown, but it has been for long speculated that bacteria and yeasts inhabiting truffles might be partially responsible for truffle aroma (Splivallo *et al.*, 2011). If this is the case, it might as well explain the apparent differences of the influence of maturation and geographical origin on white and black truffle aroma.

The results presented here give a short term view on the genetic diversity of Burgundy truffles within single orchards and on the possible factors influencing truffle aroma. Translating these findings into usable results for truffle cultivation will now require studies which consider all factors in a comprehensive manner (i.e. genotype, soil, climate, microbes, volatile profiles), which span a sufficient period (years) and with sufficient replicates (truffles per orchard as well as truffle orchards) to disentangle the contribution of each factor towards truffle productivity and aroma quality.

Acknowledgements

The work presented was supported by the “Conseil Régional de Bourgogne (Programme Jeune Chercheur Entrepreneur; Grant 20100112095254682-1)”. Financial support was also provided by the German Research Foundation (DFG) grant SP119112-2 to RS. The authors thank the strategic platform “GENTYANE” INRA, Ibis 2009 and its group leader Mr Poncet.

Table 1: Allele frequencies for each locus in each population
In bold, majority allele for each SSR marker and for each population)

Locus	Allele	Allele frequency	
		Daix(artificial)	Tarsul(natural)
aest27	314	0.107	0.273
	317	0.179	0.273
	320	0.536	0.364
	323	0.036	0.000
	326	0.107	0.000
	335	0.036	0.000
	338	0.000	0.091
	339	0.000	0.000
aest29	201	0.250	0.000
	206	0.107	0.091
	211	0.179	0.000
	216	0.464	0.727
	226	0.000	0.182
aest31	305	0.036	0.000
	310	0.571	0.273
	315	0.321	0.727
	325	0.071	0.000
aest35	124	0.071	0.000
	144	0.571	0.909
	148	0.321	0.000
	160	0.036	0.091
aest36	322	0.107	0.818
	326	0.857	0.091
	346	0.036	0.091

Locus	Allele	Allele frequency	
		Daix(artificial)	Tarsul(natural)
aest6	212	0.071	0.000
	218	0.500	0.909
	224	0.036	0.000
	230	0.214	0.000
	236	0.179	0.091
aest10	280	0.357	0.182
	290	0.286	0.364
	295	0.250	0.364
	305	0.071	0.000
	310	0.036	0.091
aest18	136	0.107	0.091
	144	0.536	0.727
	156	0.357	0.182
	166	0.000	0.000
aest25	122	0.214	0.182
	128	0.429	0.727
	137	0.321	0.000
	140	0.036	0.091
aest26	139	0.071	0.182
	142	0.179	0.455
	145	0.000	0.091
	151	0.036	0.000
	154	0.036	0.000
	157	0.464	0.091
	168	0.000	0.000
	178	0.214	0.182

Table 2: Number of ascocarps, number of haplotypes, average number of alleles (Na); average number of effective alleles (Ne) and expected heterozygosity (H) over loci for each population.

Population	No. of ascocarps	No. of haplotypes	Na (Mean and SE over Loci for each Pop)	Ne (Mean and SE over Loci for each Pop)	H (Mean and SE over Loci for each Pop)
Daix (artificial)	28	17	4.4 (0.340)	2.719 (0.208)	0.604 (0.043)
Tarsul (natural)	11	8	3.1 (0.314)	2.096 (0.292)	0.445 (0.065)
Overall	39	25	3.750 (0.270)	2.407 (0.188)	0.524 (0.042)

Na = No. of Different Alleles

Ne = No. of Effective Alleles = $1 / (\sum p_i^2)$

H = Diversity = $1 - \sum p_i^2$

Where p_i is the frequency of the i th allele for the population & $\sum p_i^2$ is the sum of the squared population allele frequencies.

Table 3: Fst values between Daix (artificial) and Tarsul (natural) for each locus and for all loci.

Locus	Fst	P-value
aest6	0.1245	0.0658
aest10	-0.0255	0.7787
aest18	-0.0031	0.6868
aest25	0.0845	0.1656
aest26	0.0897	0.0881
aest27	-0.001	0.7142
aest29	0.0827	0.1588
aest31	0.1494	0.0804
aest35	0.148	0.064
aest36	0.6507	0
ALL LOCI	0.1394	0.0027

P values of 2-sided tests (obs<exp) after 10000 random permutations of locations, 10000 random permutations of individuals, and 0 random permutations of genes.

* =The negative Fst values noted in some cells should be interpreted that there is no genetic differentiation between the two population and likely reflects the imprecision of the algorithm used by the software to estimate this value. These negative values have been interpreted as 0 for further analyses

Table 4: Fst values between Daix 2010 and Daix 2011 for each locus and for all loci

Locus	Fst	p-value
aest6	0.0004	0.7052
aest10	0.0594	0.2735
aest18	0.034	0.4881
aest25	0.0812	0.2314
aest26	-0.0186	0.9715
aest27	-0.0372	0.6426
aest29	0.0539	0.26
aest31	-0.0183	0.8821
aest35	0.0437	0.3588
aest36	0.0455	0.3731
ALL LOCI	0.0242	0.3869

Figure 1: Genotypes, collection year and geographical origin of the truffle samples

Neighbour-joining analysis was used to build a tree and classify samples in genotypes (defined for a bootstrap value >70% after 1000 permutation and numbered I to X). Color codes are used to distinguish samples collected in different seasons and different locations (see legend). Note that genotypes I and III were dominant in the truffle orchard of Daix.

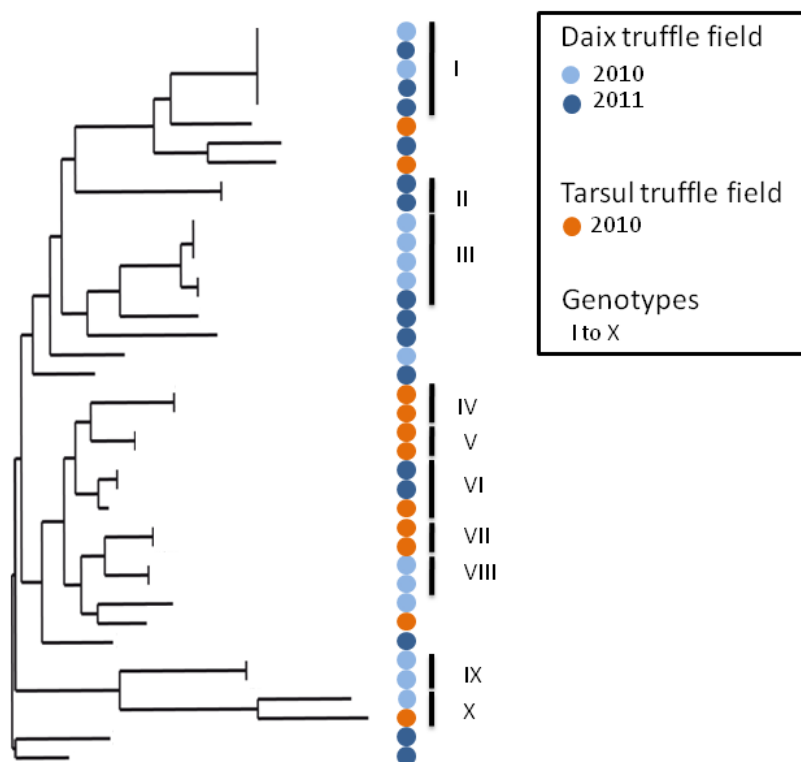


Figure 2: Concentrations of major Burgundy truffle volatiles in relation to fruiting body maturity

A heatmap illustrates the variability in concentration of major Burgundy truffle volatiles (concentrations are shown with normalized intensities) for three maturity categories (Immature: 0-30 %, mature 31-70 % and fully mature 71-100 %). The concentration of none of the volatiles were maturity dependent with the exception of volatile (19) (2-butanone) which was mostly produced by mature and fully mature truffles. Volatiles (1) 1-propanol; (2) 2-butanol; (3) 2-methylbutanol; (4) 2&3-methyl-1-butanol; (5) 3-methyl-1-butanol; (6) hexanal; (7) 2-methylpentanal; (8) 2-methyl-2-pentenal; (9) benzaldehyde; (10) 1-octen-3-one; (11) 1-octen-3-ol; (12) 3-octanone; (13) 2-octanone; (14) 3-octanol; (15) *trans*-2-octenal; (16) 2-methyl-2-methylbutanoate; (17) 2-pentylfuran; (18) dimethylsulfide; (20) 2-heptanone; (21) 4-hydroxy-3-hexanone; (22-26) unidentified volatiles.

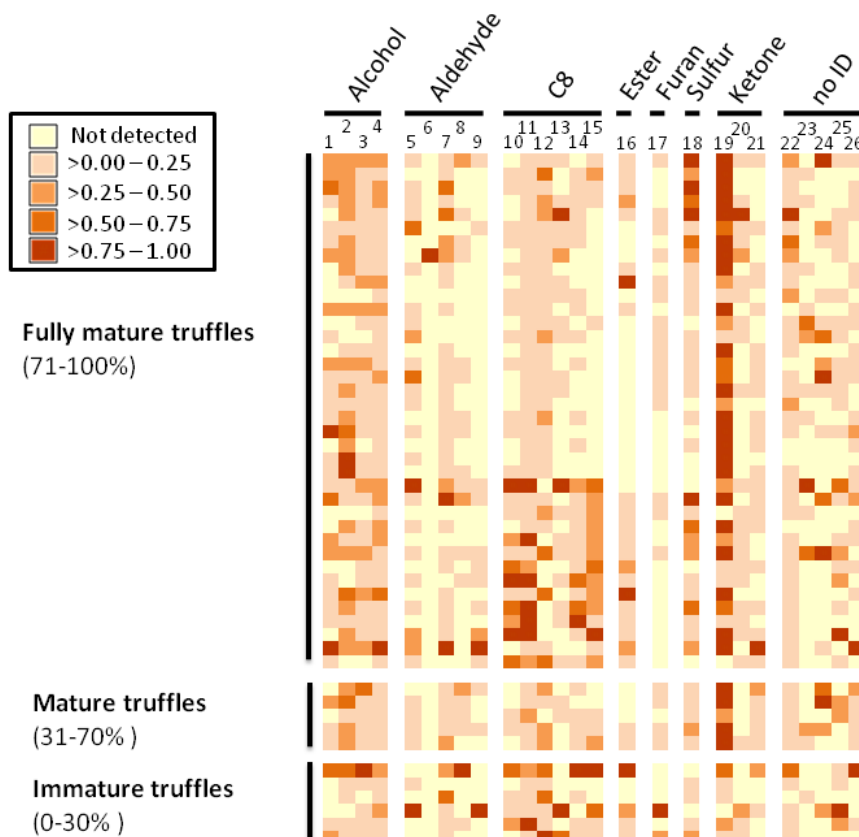


Figure 3: 2-Butanone is preferentially produced by mature and fully mature truffles
Normalized concentrations of 2-butanone are shown for different maturity stages as boxplots.

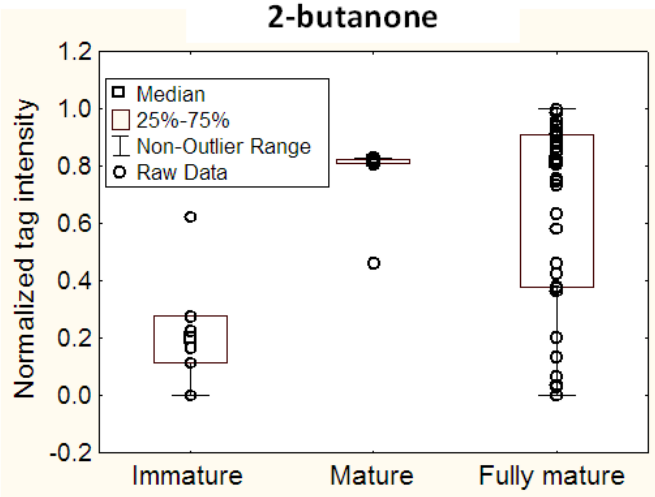


Figure 4: Concentrations of Burgundy truffle volatiles in peridium and gleba
A heatmap illustrates the variability in concentration of all Burgundy truffle volatiles (concentrations are shown with normalized intensities) in the peridium and the gleba of 11 fruiting bodies labeled A to K. Note that qualitatively, peridium and gleba have overall the exact same composition.

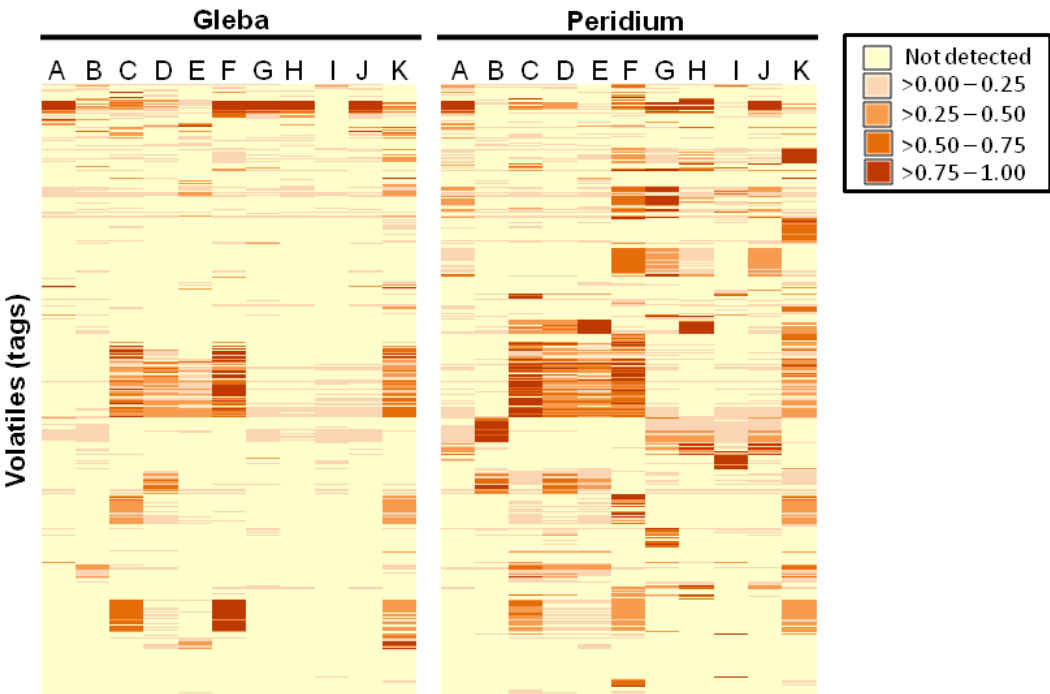


Figure 5: Truffle peridium emits more volatiles than truffle gleba

Normalized concentrations of benzaldehyde and 2 and 3-methyl-1-butanol are shown for peridium and gleba as boxplots. Note that both volatiles were produced in significant higher quantities in Burgundy truffle peridium.

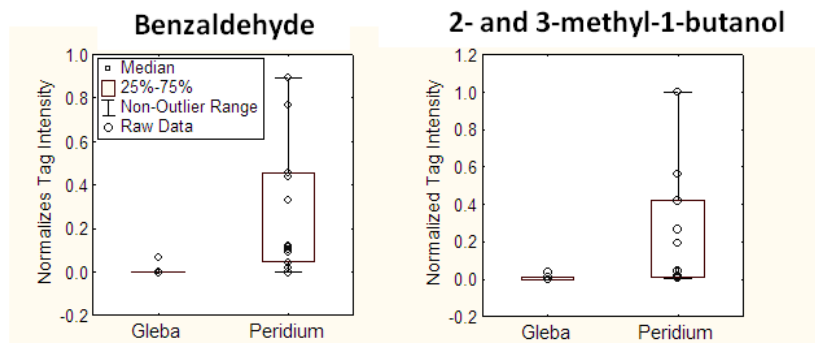


Figure 6: Concentrations of major Burgundy truffle volatiles in relation to genotype

A heatmap illustrates the variability in concentration of major Burgundy truffle volatiles (concentrations are shown with normalized intensities) for the genotypes identified in this study (numbered I to X). Refer to Fig. 2 for the identity of volatiles 1-26.

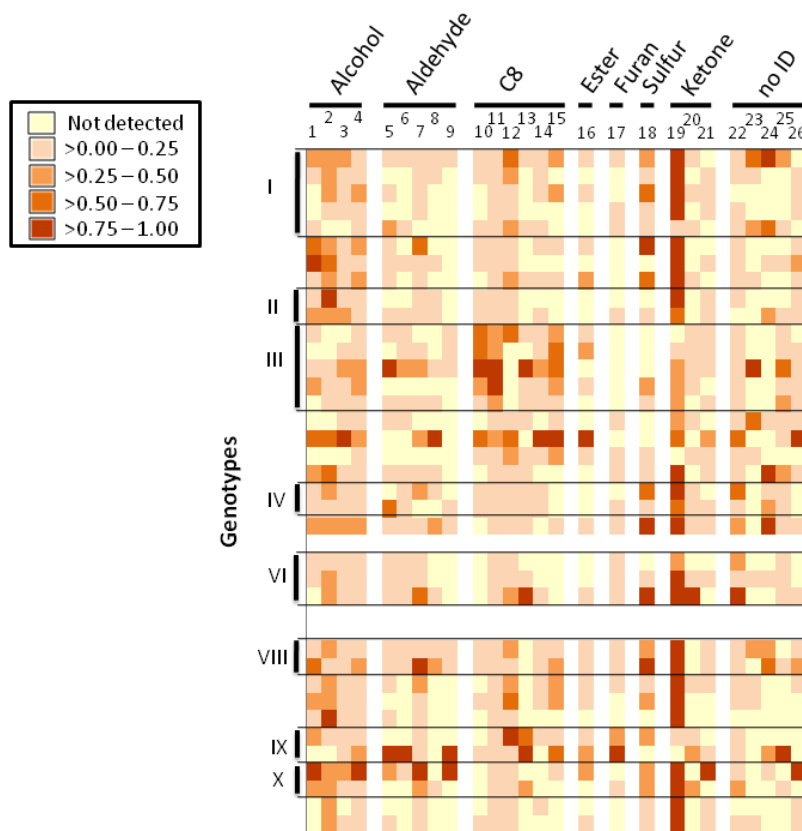


Figure 7: Concentrations of all Burgundy truffle volatiles in relation to genotype
A heatmap illustrates the variability in concentration of all Burgundy truffle volatiles (concentrations are shown with normalized intensities) for the genotypes identified in this study (numbered I to X). Refer to Fig. 2 for the identity of volatiles 1-26.

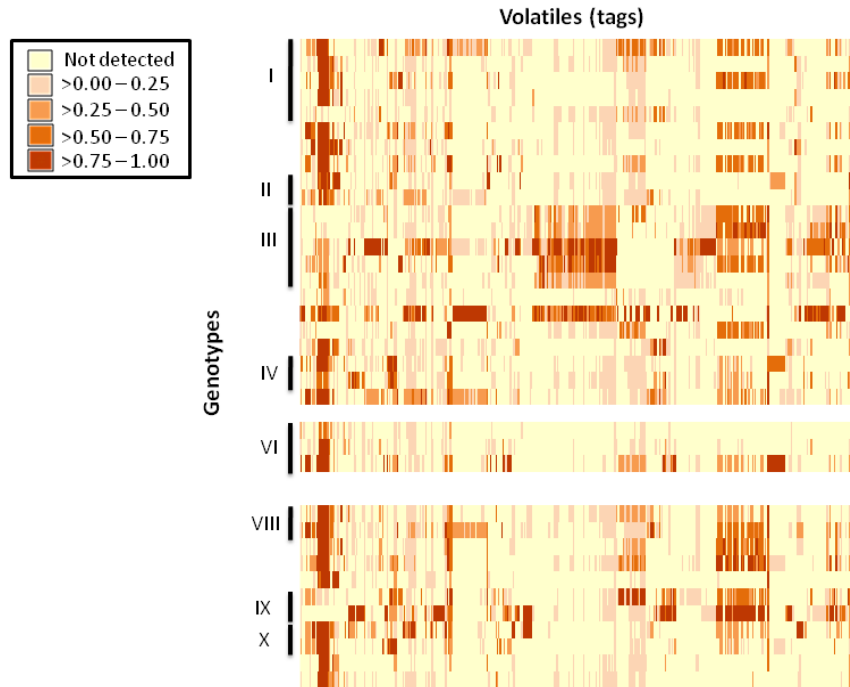


Figure 8: Concentrations of major Burgundy truffle volatiles in the two dominant genotypes of the Daix orchard

No significant differences were detected in the concentrations of major Burgundy truffle volatiles between genotypes I and III with the exception of three C8-VOC (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ Mann Whitney U Test)

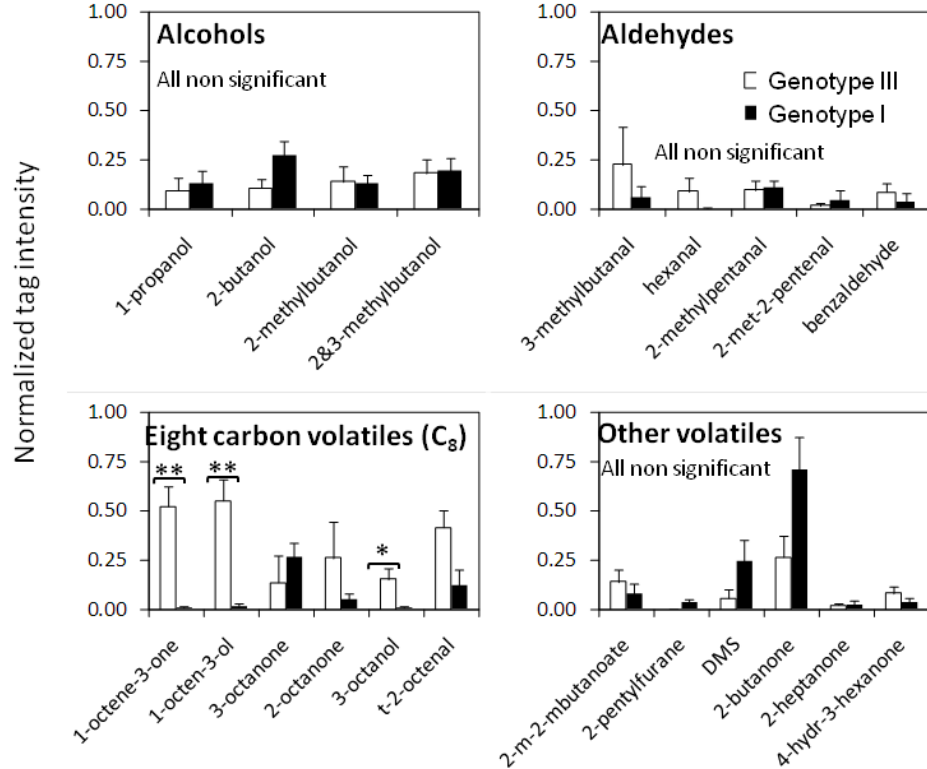
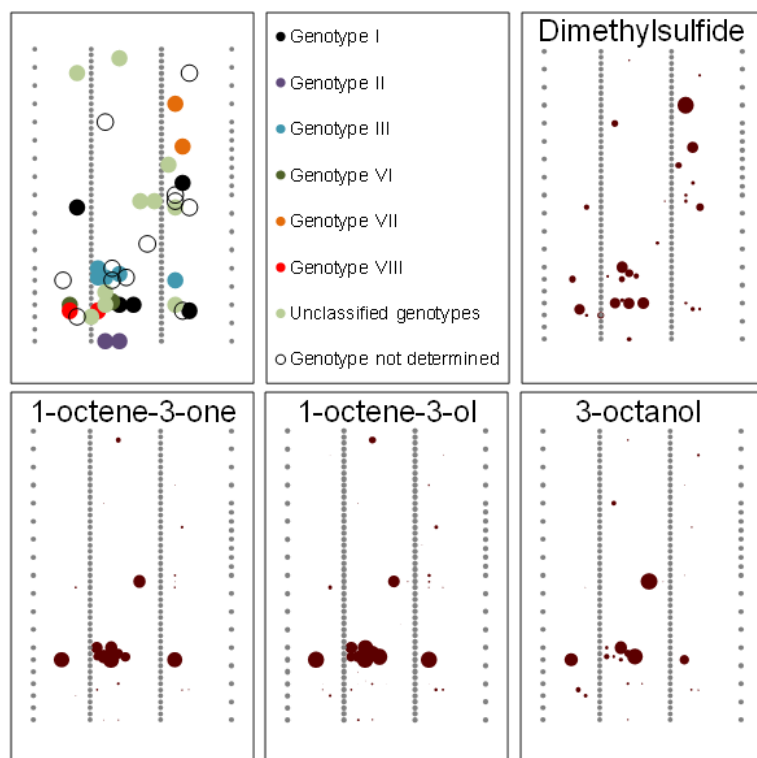


Figure 9 : Distribution of single volatiles and genotypes in the truffle orchard of Daix
Genotypes I to X identified in Fig. 1 have been color coded. Three major truffle volatiles are shown as bubble plots overlaid on the truffle field. Refer to the main text for further details.



References

- Barbieri E, Bertini L, Rossi I, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guidi C, Zambonelli A, Stocchi V. 2005. New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiology Letters* 247: 23–35.
- Barbieri E, Guidi C, Bertaux J, Frey-Klett P, Garbaye J, Ceccaroli P, Saltarelli R, Zambonelli A, Stocchi V. 2007. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology* 9: 2234–2246.
- Boa ER. 2004. *Wild Edible Fungi: A Global Overview Of Their Use And Importance To People*. Food & Agriculture Org.
- Chevalier G (1983) Bulletin de la fédération française des producteurs de truffes , FNPT, Paris, n°6.33-50
- Chevalier G, Grente J (1973) Propagation de la mycorrhization par la truffe à partir de racines excisées et de plants inséminateurs. *Annales de Phytopathologie* 5:317-318
- Chevalier G, Grente J, Pollacsek A (1973) Obtention de mycorrhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Annales de Phytopathologie* 5:107-108.
- Culléré L, Ferreira V, Chevret B, Venturini ME, Sánchez-Gimeno AC, Blanco D. 2010. Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry. *Food Chemistry* 122: 300–306.
- Culléré L, Ferreira V, Venturini ME, Marco P, Blanco D. 2013. Chemical and sensory effects of the freezing process on the aroma profile of black truffles (*Tuber melanosporum*). *Food chemistry* 136: 518–525.
- Fassi B, Fontana A (1967) Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. I. Micorrize e sviluppo dei semenzali nel secondo anno. *Allionia* 13:177-186
- Gioacchini AM, Menotta M, Guescini M, Saltarelli R, Ceccaroli P, Amicucci A, Barbieri E, Giomaro G, Stocchi V. 2008. Geographical traceability of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) by the analysis of volatile organic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 22: 3147–3153.

- Hall IR, Yun W, Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21: 433–438.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2 (4):618–620. doi:10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x
- Leeuwen C van, Friant P, Choné X, Tregoat O, Koundouras S, Dubourdieu D. 2004. Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. *American Journal of Enology and Viticulture* 55: 207–217.
- Linde CC, Selmes H. 2012. Genetic diversity and mating type distribution of *Tuber melanosporum* and their significance to truffle cultivation in artificially planted truffières in Australia. *Applied and environmental microbiology* 78: 6534–6539.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J. 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography—mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24: 732–737.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buee M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marcais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P (2010) Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464 (7291):1033–1038. doi:10.1038/nature08867
- Mello A, Cantisani A, Vizzini A, Bonfante P. 2002. Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environmental Microbiology* 4: 584–594.
- Mello A, Murat C, Vizzini A, Gavazza V, Bonfante P. 2005. *Tuber magnatum* Pico, a species of limited geographical distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle ground. *Environmental Microbiology* 7: 55–65.
- Molinier V, Murat C, Morin E, Gollotte A, Wipf D, Martin F (2013) First Identification of Polymorphic Microsatellite Markers in the Burgundy Truffle, *Tuber aestivum* (Tuberaceae). *Applications in Plant Sciences* 1 (2):1200220. doi:10.3732/apps.1200220

- Murat C, Diez J, Luis P, Delaruelle C, Dupre C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 164 (2):401-411. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01189.x
- Murat C, Riccioni C, Belfiori B, Cichocki N, Labbé J, Morin E, Tisserant E, Paolocci F, Rubini A, Martin F. 2011. Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 48: 592–601.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12):3321-3323. doi:10.1073/pnas.70.12.3321
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Topini F, Arcioni S. 2004. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? *FEMS Microbiology Letters* 235: 109–115.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6 (1):288-295. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S (2005) Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11):6584-6589. doi:10.1128/aem.71.11.6584-6589.2005
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011. *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytologist* 189: 723–735.
- Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P. 2011. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist* 189: 688–699.
- Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt J-P, Feussner I, Karlovsky P. 2012. Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *The New phytologist* 194: 823–835.
- Stenberg P, Lundmark M, Saura A (2003) MLGsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Molecular Ecology Notes* 3 (2):329-331. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00408.x

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10):2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Wedén C, Danell E, Camacho FJ, Backlund A. 2004. The population of the hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland. *Mycorrhiza* 14: 19–23.
- Zeppa S, Gioacchini AM, Guidi C, Guescini M, Pierleoni R, Zambonelli A, Stocchi V. 2004. Determination of specific volatile organic compounds synthesised during *Tuber borchii* fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 199–205.



Chapitre IV :

Etude de la production d'une truffière
plantée (noisetiers / *Tuber melanosporum*) en
Bourgogne



Chapitre IV : Etude de la production d'une des premières truffières plantées (*Corylus avellana* / *Tuber melanosporum*) en Bourgogne.

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'analyse de données de récolte sur plus de trente ans au sein d'une truffière plantée de noisetiers inoculés initialement par *Tuber melanosporum*.

A la fin des années 1960, des techniques d'inoculations à partir de corps fructifères ont permis la mise en place de plants truffiers. Historiquement, *Tuber melanosporum* a été la première truffe utilisée pour de telles inoculations. Au début des années 1970, les premières truffières plantées (de plants inoculés avec *T. melanosporum*) ont vu le jour ; la truffière que nous avons étudiée figure parmi les premières plantées en France.

Cette truffière, située en Côte d'Or, a été plantée en 1977. Depuis, elle a été régulièrement entretenue et irriguée. A partir de la première récolte en 1980, chaque truffe a été répertoriée ainsi que l'arbre sous lequel elle a été cavée. D'autres informations ont été relevées comme notamment le poids pour chacune des truffes. Au bout de quelques années, *Tuber melanosporum* a disparu au profit de *Tuber aestivum* qui était, vraisemblablement, présente naturellement.

Notre objectif principal était d'établir un premier bilan de ces trente années de récolte qui constituent un ensemble de données relatives à une truffière, quasi unique de par leur échelle temporelle. Grâce à des analyses statistiques simples, nous avons pu noter les fluctuations tant en quantité qu'en poids des truffes récoltées suivant les saisons et les arbres truffiers.

De plus, il apparaît que le remplacement de *Tuber melanosporum* par *Tuber aestivum* s'est fait de manière très rapide (trois ans). La disparition de *Tuber melanosporum* peut probablement être expliquée par la fermeture de la canopée des noisetiers, *T. melanosporum* n'appréciant pas un ombrage excessif.

Cette partie a été rédigée sous la forme d'un article scientifique qui sera prochainement soumis à « Agroforestry system » (Article 6).

Article 6 : Monitoring 30-year history of a truffle orchard: from *Tuber melanosporum* to *Tuber aestivum*.

Auteurs:

Virginie Molinier¹, Marie-Lara Bouffaud¹, Arnaud Mounier¹, Annie Colombet¹, Henri Frochot², Daniel Wipf¹

¹UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/Université de Bourgogne, Pôle « Interaction Plantes-Micro-organismes » ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

²3 rue Forge 21120 Tarsul, France

Corresponding authors:

Virginie Molinier

virginie.molinier@gmail.com,

Phone number: +33(0)380693567

Fax number: +33(0)380693753

Virginie Molinier¹, Marie-Lara Bouffaud¹, Arnaud Mounier¹, Annie Colombet¹, Henri Frochot²,
Daniel Wipf¹

Monitoring 30-year history of a truffle orchard: from *Tuber melanosporum* to *Tuber aestivum*.

¹ UMR Agroécologie INRA 1347/Agrosup/Université de Bourgogne, Pôle « Interaction Plantes-
Micro-organismes » ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² 3 rue Forge 21120 Tarsul, France

Corresponding authors:

Virginie Molinier

virginie.molinier@gmail.com,

Phone number: +33(0)380693567

Fax number: +33(0)380693753

24 **Abstract**

25 Truffles are clearly ranging among the world's most exclusive delicacies. In the late 1960's,
26 inoculation of the root systems of host plant with ectomycorrhizal fungi has been developed and
27 *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum* cultivation by planting orchards of inoculated
28 seedlings has been extended to different countries. The present work focuses on one of the first
29 *Tuber melanosporum* orchards planted in Burgundy (France). The main objective of our study
30 was to follow the truffle production and the evolution of this orchard at a long-term scale (more
31 than 30 years). By recording different parameters, as for example number of truffles or average
32 truffle weight, we could infer the evolution of the orchard. The most relevant result of this work
33 is the observation of the progressive, but fast, replacement of the inoculated *Tuber*
34 *melanosporum* by the Burgundy naturally occurring *Tuber aestivum*, much adapted to the local
35 ecosystem. The results of our study constitute a preliminary for developing a valuable tool for
36 optimisation of truffle orchard management.

37

38 Introduction

39 True truffles consist of fungi in the Ascomycota that belong to the genus *Tuber* of the
40 *Tuberaceae*. They develop edible hypogeous fruit bodies and form ectomycorrhizal symbiosis
41 with different host trees such as hazels (*Corylus* spp), oaks (*Quercus* spp) and hornbeams
42 (Chevalier and Frochot 1997; Rioussset et al. 2001). More than two hundred species have been
43 described so far but it could be that different names have been assigned to the same species
44 (Bonito et al. 2010; Jeandroz et al. 2008). In Europe, about thirty species have been recognized
45 (Ceruti et al. 2003), among which *Tuber magnatum*, *T. aestivum* and *T. melanosporum* are
46 renowned owing to their aromatic and gastronomic properties. Among the most famous truffles
47 worldwide is *T. melanosporum*, “the Périgord black truffle”, whose economical value averages
48 4000€/per fresh kg. This species presents a black peridium, a dark gleba (spore-bearing), a winter
49 maturity period, and a relatively restrictive native habitat. Actually, in natural conditions, *T.*
50 *melanosporum* is harvested very locally, in calcareous zones in South Europe (Italy, France,
51 Spain...). However, the development in the late 1960’s of inoculation procedures (Chevalier et al.
52 1973; Palenzona 1969) has made possible the extension of truffle production to different
53 countries by planting orchards with tree host seedlings colonized with *T. melanosporum*. Another
54 truffle species, with a weaker economical value, *T. aestivum*, is also commonly cultivated in
55 different areas. This species has a wide natural range of distribution throughout Europe from
56 Sweden to Spain, and has even been recorded in North-Africa (Jeandroz et al. 2008) and China
57 (Song et al. 2005). *T. aestivum* presents a dark peridium and a brown gleba. This species has a
58 maturity period different according to the climates. Indeed, in meridional regions, it has a
59 summer maturity period whereas in the more northern regions, its maturity occurs during fall.
60 Large-scale *T. aestivum* plantations have been attempted in several countries during the last

decades, and nowadays, it is worthwhile to note that around fifty percent of the truffles harvested in Europe originate from *Tuber* ssp.-inoculated orchards (Hall et al. 2003).

In Burgundy (France), the most widespread truffle consists of *T. aestivum*, which is well adapted to this region. Nevertheless, several man-made *T. melanosporum* orchards with truffle yielding also exist in Burgundy. In this work, we focused on one of the first *T. melanosporum* orchards planted in Burgundy (in 1977), thereby giving the opportunity to survey in a long-term the outcome of an introduced truffle ectomycorrhiza. Actually, the fate of *T. melanosporum* associated with hazelnut trees has been recorded since four years after planting with special regard to truffle production and morphological characterisation of fruiting bodies. In this study, we have analyzed the data collected over this thirty-year time period to assess the evolution of truffle yield and fungal species distribution. Noteworthy, the results obtained pointed out the replacement of the introduced *T. melanosporum* by the Burgundy naturally occurring *T. aestivum*.

Materials and methods

Seedling inoculation

Inoculated plants were prepared axenically from wild hazelnuts and wild *T. melanosporum* fruit bodies. Hazelnut seeds were previously collected under a 20 years old tree in Tarsul (Cote d'Or, France), pre-treated during four months at 5°C, and further sterilized during 24 hours in diluted bleach. Hazelnut seeds were germinated on vermiculite at the end of March 1976. Finally, young hazel trees were grown on vermiculite in nursery plots with an eastern exposition in Pulnoy (Meurthe-et-Moselle, France) until truffle inoculation. Truffle ascocarps were collected in 1975 (December 29th) in Val Suzon (Côte d'Or, France). Truffles were

conserved during six months (January to June, 1976) in three different “cold modes”: -15°C (31g), -10°C (34g) and +5°C (150g). Whole truffles were crushed in 1976 (June 13th) to prepare the inoculation mix. One hundred and forty plants were inoculated with crushed truffles (215g) and then transferred in pots with sterilized soil (1.54g crushed truffles by plant on average). Mycorrhization was assessed in December (20th) and all plants were recorded as mycorrhized regardless the “cold mode” used for truffle conservation. In 1977 (March 10th), 98 inoculated young hazelnut trees, numbered from 1 to 98, were planted at their definitive places in the truffle orchard (Figure 1).

Description of the truffle orchard

The experimental truffle orchard consists of a plot (100 meters x 22 meters) located near Daix (Côte d’Or, France). This plot is surrounded by fields, gardens, vineyards and fruit orchards. No tree putatively colonized by truffle was present in the vicinity. The main characteristics of the soil are a clay-rich (15 to 20%) calcareous nature, a red-brown colour, and the presence of little rocks and fossils. The soil is filtering but retains well moisture on bedrock at 80 cm deep. The plot has a slight slope facing northeast. Two years before the beginning of the experiment, alfalfa was cultivated on the field but no cultivation was performed the year before planting the orchard. Inoculated hazelnut trees were planted in two rows at intervals of 2 meters between trees and 6 meters between rows. Additionally, fruit trees were planted on both sides of the plot at a distance of 5.5 meters of each row, as schematised in Figure 1.

Sampling

Harvest of truffle fruit bodies started four years after planting in 1980 (December 27th) using a truffle-searching dog. In the current study, a time unit, *i.e.* from September year N to March year (N+1), refers to the truffle production season (for example, “1980/1981”

encompasses the time period from September 1980 to the end of March 1981). For easy reading, seasons were numbered from 1(1980/1981) to 26 (2011/2012) as illustrated in Table 1. Due to environmental conditions, no harvest was attempted in 1983/1984; 1984/1985; 1985/1986; 1986/1987, 1993/1994 and 1997/1998. No number was thus assigned to seasons for which truffle harvest was not performed. To map the production of truffles, we defined, for each hazelnut tree, a rectangle with following dimensions: 1 meter on each side of the tree along the planting line, 3 meters in the direction of the second row and 8 meters on the opposite side. All truffles collected on this area are attributed to the hazelnut tree located in this space. During harvestings, truffles are placed in bags numbered from 1 to 98 corresponding to the hazelnut tree area numbers. For each truffle collected, day of harvest, fresh weight, and tree position (Figure 1) were recorded in a home-made database. It is worth noting that a minimum weight of 5 g was assigned to very small fruit bodies. Each truffle was identified using usual morphological criteria (Riousset et al. 2001).

Data analysis

Data were organized in R software (<http://www.r-project.org/>) using the R package “doBy” (Højsgaard et al. 2012). One way ANOVA and Fisher’s LSD tests ($P < 0.05$) were used to compare treatments i) between harvesting seasons for average number of truffles and average weight of truffles and ii) between hazelnut trees for average weight of truffles using the R package “agricolae”(De Mendiburu 2012). Data representation was performed in R software with the R package “ggplot2” (Wickham 2009). The R package “sp” (Pebesma and Bivand 2005) was used to figure the spatial representations of the truffle orchard.

Results and Discussion

Impact of seasons on truffle production

The first harvest, which occurred four years after out planting, yielded 259 fruit bodies representing a total weight of 2 kg (Table 1). During this first season, 71 hazelnut trees out of the 98 planted (72%) produced at least one truffle. Noteworthy, only the *T. melanosporum* morphotype was identified in the 259 fruit bodies analysed, thus highlighting the possibility to introduce a *T. melanosporum*-yielding hazelnut plantation in Burgundy and the success of the inoculation process (Chevalier 1983).

Collectively, over the 26 seasons with truffle harvests, 4531 fruit bodies were collected (all species mixed) representing a total weight of nearly 77 kg, and 174.27 truffles harvested per season on average. As illustrated in Figure 2, it nonetheless appeared that the orchard production was highly dependent on the season of harvest. Actually, during season 8 (1991/1992) a maximum of 763 truffles was collected whereas in season 14 (1999/2000) only 26 truffles could be harvested (minimum). Statistical differences were found between seasons concerning average number of truffles by hunting ($P= 2.6 \times 10^{-6}$) and average weight of truffles ($P= 2.0 \times 10^{-6}$). Seasons 6, 7, 8, 9, 17 and 19 were the most productive with regard to the number of fruit bodies (Table 1 and Figure 2a). This observation also held true when considering the mean number of truffles collected per hunting, which refers to a single day of harvest. Generally, seasons with numerous fruit bodies (Figure 2a) corresponded to those for which the number of truffles by hunting was high (Figure 2b). Likewise, truffle total weight distributed as truffle total number over the 26 seasons (Figure 2b and 2a respectively). Indeed, the maximum total weight of truffles harvested was reached during seasons 6, 7, 8, 9, 17 and 19 (Figure 2c). By contrast, when considering the average truffle weight per season (Figure 2d), its distribution appeared different from that observed for the total number and total weight of truffles harvested during one season

(Figures 2b, 2C). Noteworthy, whereas seasons 6, 7, 8, 9, 17 and 19 were the most productive in term of total weight and amount, they did not display significant difference with several other seasons regarding the average weight.

Impact of hazelnut tree on truffle production

Statistical differences were recorded between hazelnut trees concerning average weight of truffles ($P= 2.0 \times 10^{-16}$). Contrasting with the average truffle weight recorded per tree (Figure 3c), a similar distribution was observed when considering the total number of truffles per tree (Figure 3a) and the total weight of truffles harvested per tree (Figure 3b). Over the 26 seasons of harvest, the maximum number of fruit bodies was collected under tree 63 with a total of 126 truffles, whereas the minimum was recorded under tree 35 with a total of 4 truffles (Figure 3a), thus indicating that the total truffle production was not equal between hazelnut trees. These results have to be balanced due to the fact that, in natural conditions, it was impossible to survey the below-ground root system to surely assign a truffle to its genuine host tree. As a result, the expression “production area” instead of “producing tree” sounded more appropriate. When analyzing the total weight and total number of fruit bodies collected per area for each season (Figures 4a and 4b), seasons 6, 7, 8, 9, 17 and 19 were confirmed as the most productive. Noteworthy, it also turned out that the best area for truffle production was not static over time and changed with seasons (Figure 4). Consequently, truffle yield was at least dependent on two interacting parameters: the area position and the season.

Transition from *Tuber melanosporum* to *Tuber aestivum*

Inferred from the morphological identification of each truffle collected over the 26 seasons, Figure 5 displays the relative distribution of *T. melanosporum* per harvest. From season 1 to season 8, only the *T. melanosporum* morphotype was identified, thus highlighting the

possibility to introduce and maintain over a long-term period a *T. melanosporum*-yielding hazelnut plantation in Burgundy. However, during season 9, the first *T. aestivum* fruit bodies were detected in the truffle plantation. When addressing the putative origin of this species, its natural occurrence within the orchard plot seemed more likely than an exogenous import. Actually, only *T. melanosporum* fruit bodies were used to inoculate hazelnut trees and the presence of *T. aestivum* or other truffle species was not recorded on the seedlings before planting and during the first years of the orchard. From season 9, the number of *T. aestivum* fruit bodies collected continued increasing regularly, and by season 12, *T. aestivum* became quantitatively dominant (Figure 5). The orchard evolved rapidly and four years only after appearance (season n°13, 1998/1999), *T. aestivum* seemed to have totally replaced *T. melanosporum*. It is interesting to note that concomitant to the apparition of *T. aestivum*, *T. mesentericum* fruit bodies also developed. However, this later species, also likely to be of endogenous origin, displayed a rather stochastic dynamics relative to *T. aestivum*, and did not manage to expand in the orchard (Figure 5).

Although most of the fruit bodies collected over the thirty-year history of the truffle plantation have escaped molecular studies, all the microsatellite-based analyses (Molinier et al. 2013) performed so far (2010-2011/2011-2012) confirmed morphological typing (data not shown). By reason of their economic value, the behaviour of introduced truffle-producing ectomycorrhizal trees has driven considerable interest and species transitions have been documented previously, which were ascribed to both intrinsic and extrinsic factors (Baciarrelli-Falini et al. 2006; Turgeman et al. 2012; Vellinga et al. 2009). In the absence of drastic environmental changes recorded in the time-period preceding the disappearance of *T. melanosporum* from our case-study, the most relevant explanation thus related to the natural

occurrence of *T. aestivum* in the orchard plot coupled to the broadest range of tolerated external conditions of *T. aestivum* compared to *T. melanosporum*. Actually, in contrast to *T. aestivum* that is rather ascribed to continental environments encompassing Burgundy, *T. melanosporum* is renowned to prefer a meridional and a strong sunlight climate together with excessive shading. The closure is also the key factor attributed to the decline in production of *T. melanosporum* in the production areas of this traditional French truffle in the last century (Ricard 2003). In addition, presence of *T. melanosporum* around truffle-oaks and *T. aestivum* under the canopy of the same tree was observed in the southern regions in France (Pierre Sourzat, pers comm).

By reason of the successful implantation of *T. melanosporum* over at least twelve seasons after out planting, the current study argued in favour of canopy closure as the main external factor responsible for its disappearance. Consequently, even if *T. melanosporum* can be cultivated in Burgundy, with a sunny exposure and adequate illumination, a less favorable situation can lead to its replacement by a more appropriate and truffle present in the environment such as *T. aestivum* or *T. mesentericum*.

Conclusion and perspectives.

To our knowledge, this is the first case-study aiming at assessing the fate of a man-made truffle orchard over a 30-year period, and thereby this study constitutes a pioneering database reference. Additionally, it reports on one of one the first *T. melanosporum* plantations introduced in Burgundy where *T. aestivum* is naturally present. The exclusive production of *T. melanosporum* during the nine first harvesting seasons for a plant majority confirms the effectiveness of the inoculation method. The absence of another truffle species harvested during this same period suggests that *T. aestivum* and *T. mesentericum* “contaminations” have

exogenous origin coming probably from surroundings. *T. melanosporum* production was important as far as conditions were favorable. Production declined along with the canopy closed, following an established pattern with this species. *T. aestivum* appeared and spread in the same period. Is it a consequence or a cause? Anyway, *T. aestivum* occupied almost entirely the truffle orchard. This shows its competitive power and expandability in environmental conditions that are suitable in terms of soil climate, exposure and plant formation. Our results show that even if *T. melanosporum* can be produced in Burgundy, when there is a competition with *T. aestivum* occurring naturally; it is probable that this latter one can become dominant in the orchard and even eradicate *T. melanosporum* from the orchard. *T. melanosporum* replacement by another truffle as *T. aestivum* is not necessarily negative. However, we cannot be sure that the replacement of truffle always operates as favorable. Also, it is more consistent to establish a truffle orchard with truffle species best adapted to the local soil climate. This is now possible that has mycorrhized trees with different species of truffles.

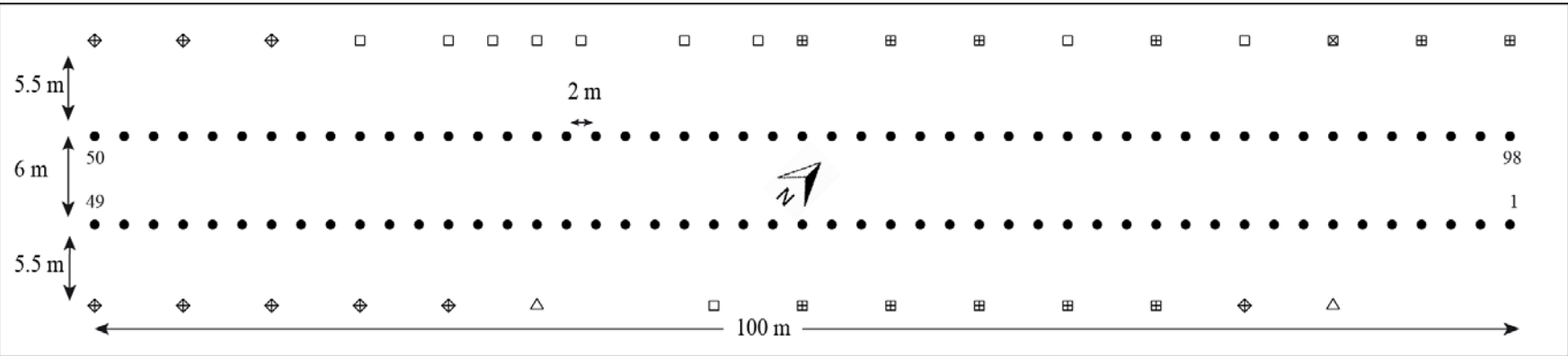
For truffle cultivation, the result is rather interesting because this orchard is still in production 35 years after planting and has overall provided significant quantities of truffles. Although further studies are required to more thoroughly investigate the mechanisms underlying *Tuber* spp. transition, the current analysis was a necessary step forward developing a valuable tool for optimisation of truffle orchard management.

Acknowledgments

Our work was supported by the “Conseil Régional de Bourgogne (Programme Jeune Chercheur Entrepreneur; Grant 20100112095254682-1)”. The authors thank Ghislaine Recorbet for critical reading of manuscript. The authors would like to thank “Tarsula”, “Tosca”, “Tzigane” and “Tignon”, the successive truffle-hunting dogs.

Table 1: Table indicating the number of hunting, the number of productive trees, the number of harvested fruitbodies and the total harvested weight per truffle production season.

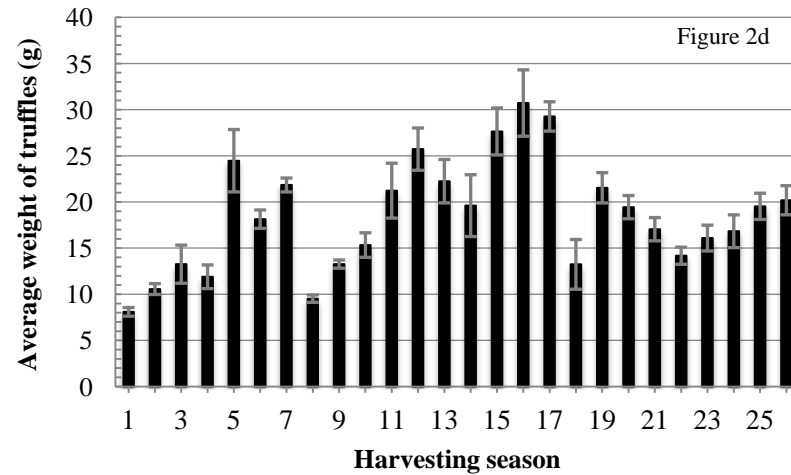
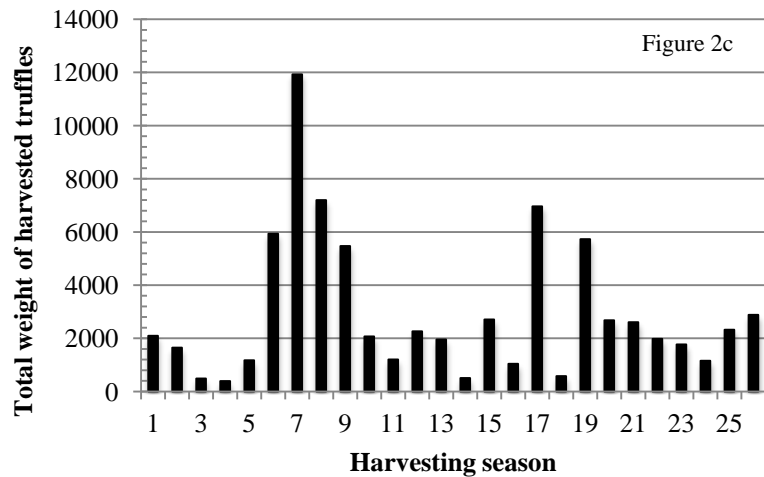
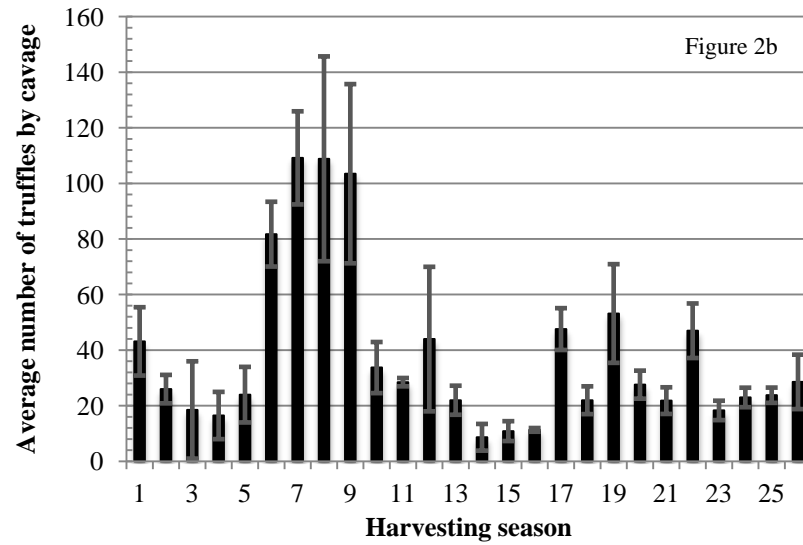
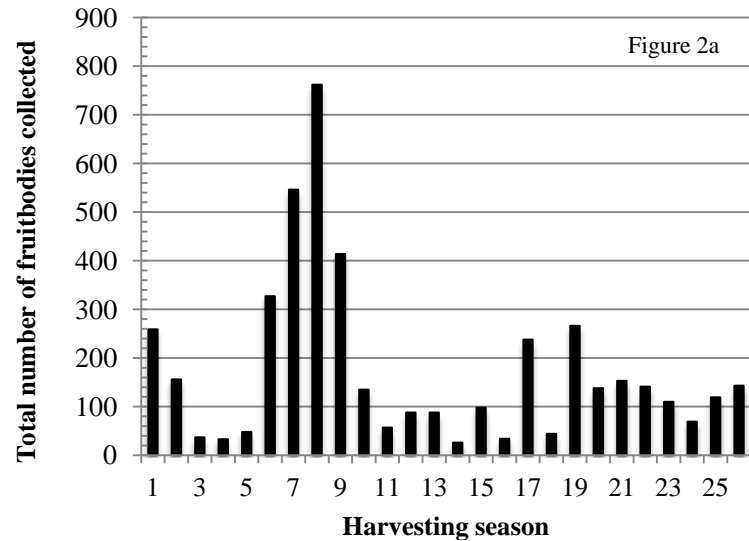
Truffle production season	Corresponding years (N, N+1)	“cavages”	Productive trees	Harvested fruit bodies	Total weight (g)
1	1980/1981	6	71	259	2099
2	1981/1982	6	47	156	1650
3	1982/1983	2	24	37	491
4	1987/1988	2	20	33	393
5	1988/1989	2	27	48	1175
6	1989/1990	4	64	327	5935
7	1990/1991	6	72	547	11935
8	1991/1992	7	74	763	7255
9	1992/1993	4	48	414	5481
10	1994/1995	4	32	135	2071
11	1995/1996	2	33	57	1210
12	1996/1997	2	38	88	2264
13	1998/1999	4	34	88	1959
14	1999/2000	3	22	26	510
15	2000/2001	9	48	98	2710
16	2001/2002	3	23	34	1044
17	2002/2003	5	72	238	6968
18	2003/2004	3	29	44	583
19	2004/2005	5	68	266	5731
20	2005/2006	5	59	138	2683
21	2006/2007	7	53	153	2609
22	2007/2008	3	50	141	1991
23	2008/2009	6	53	110	1771
24	2009/2010	3	39	69	1162
25	2010/2011	5	44	119	2324
26	2011/2012	5	46	143	2888
Total		113		4531	76892



- apple and pear trees
- ⬢ cherry trees
- △ peach and almond trees
- ⊞ plum trees
- ⊞ walnut trees
- hazel trees

Figure 1: Map of the experimental truffle orchard. Each black dot corresponds to an inoculated hazelnut tree. Each symbol corresponds to a fruit tree: a white square for apple and pear trees, a vertical cross lozenge for cherry trees, a white triangle for peach and almond trees, a vertical cross square for plum trees and a diagonal cross square for walnut trees. Black arrows indicate distances in meters between trees. The North orientation is indicated by a symbol in the middle of the map.

Figure 2: Productivity of the different harvesting seasons: total number of fruit bodies collected (Figure 2a), average number of truffles by hunting (Figure 2b), total weight of harvested truffles (Figure 2c) and average weight of harvested truffles (Figure 2d).



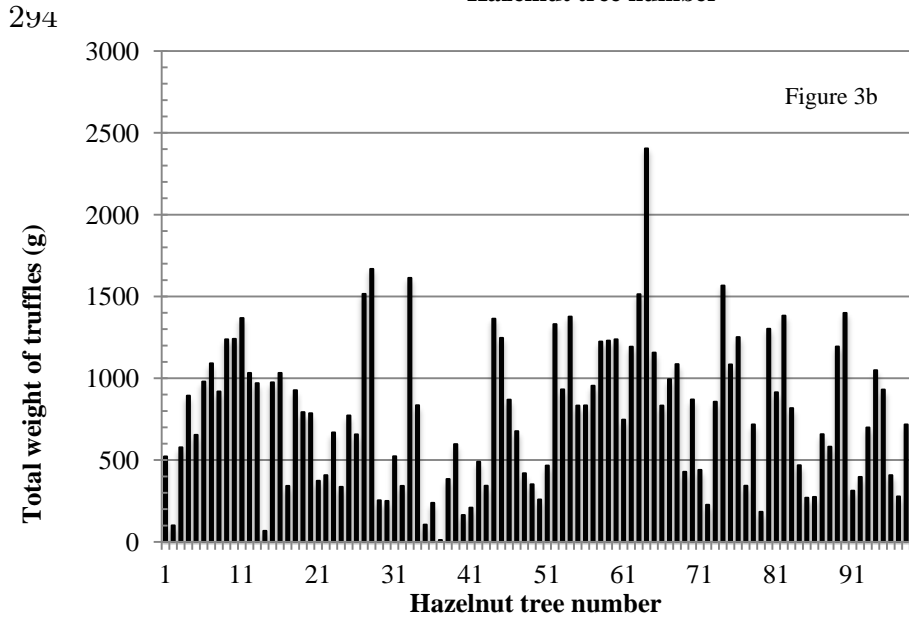
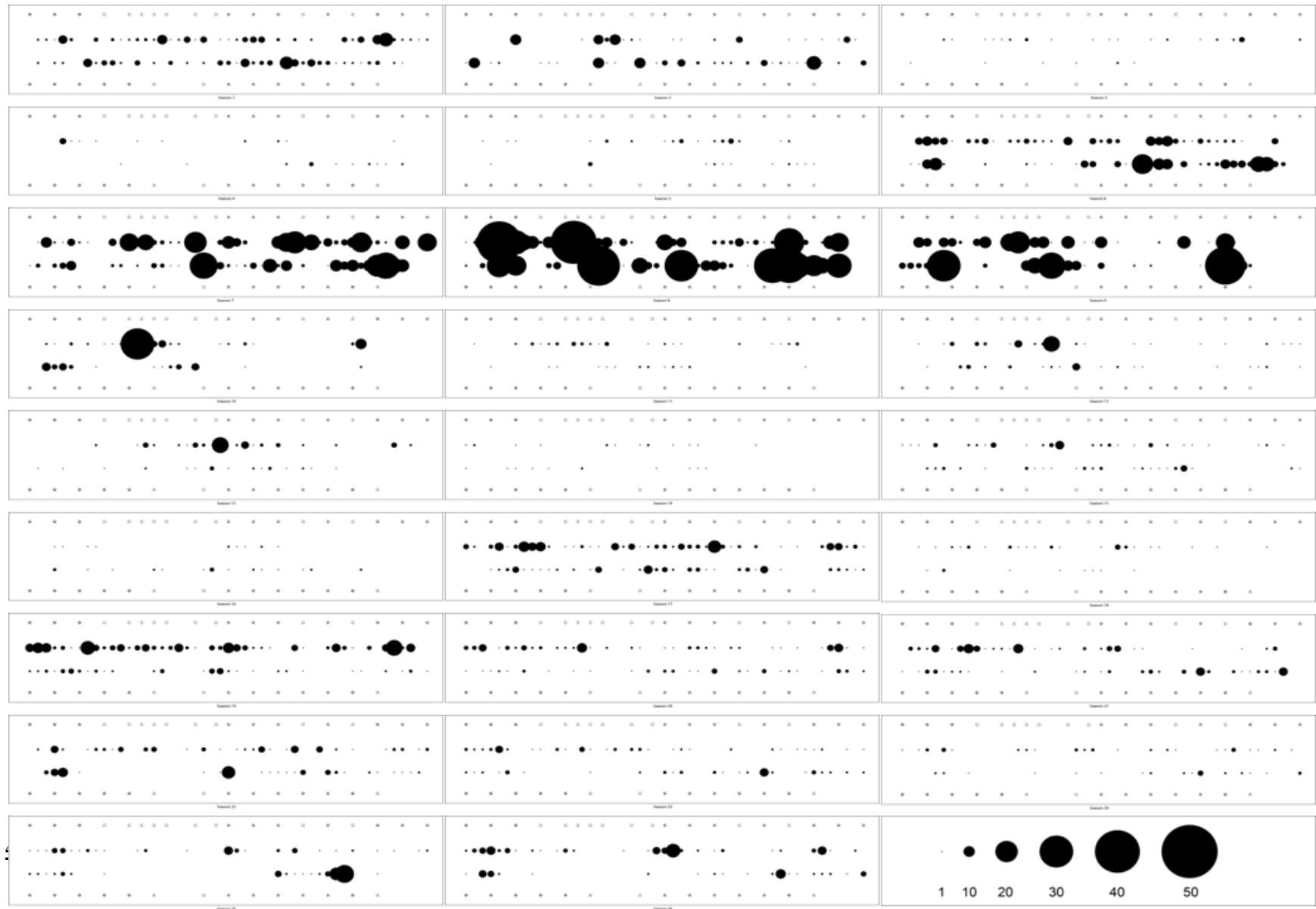


Figure 4: truffle orchard maps indicating the number of fruit bodies harvested (Figure 4a) and total weight of truffles harvested (Figure 4 b) by hazelnut tree for each harvesting season. Truffle harvesting season are indicated in the left upper corner of each map. The last map in the lower right corner of figures 4a and 4b represents the scale used for the number of fruit bodies and the total weight of harvested truffles respectively.

4a:



320 **4b:**

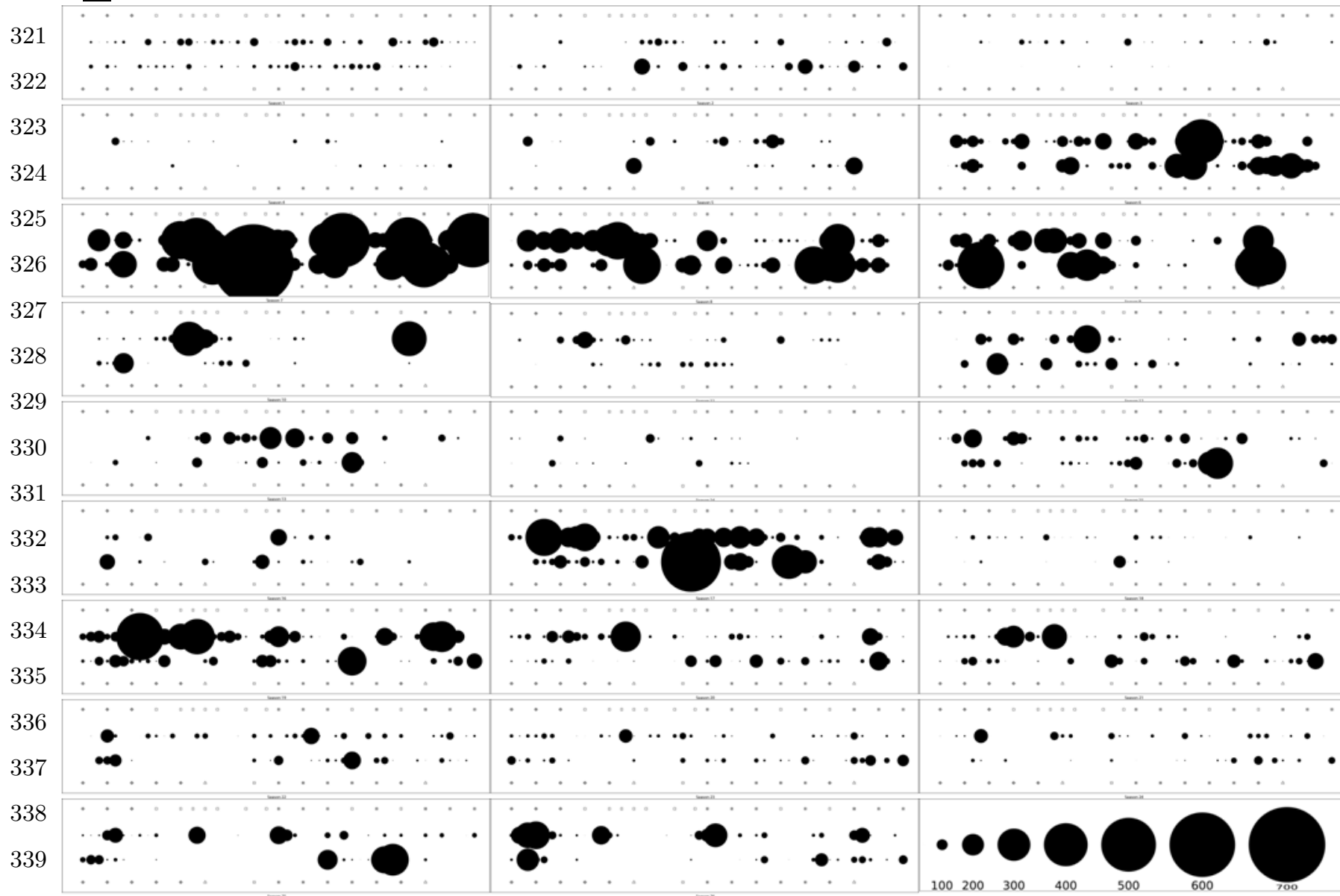
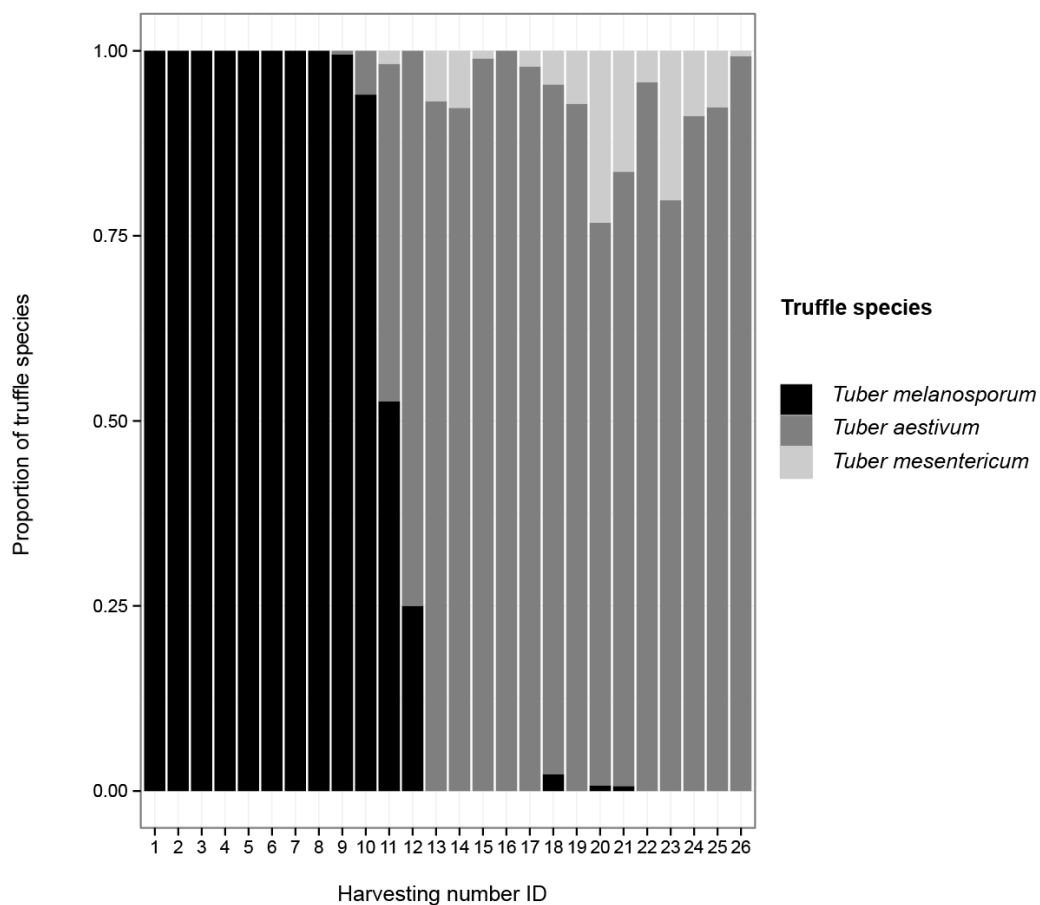


Figure 5: Respective proportions of *T. melanosporum*, *T. aestivum* and *T. mesentericum* collected by harvesting season. Black colour represents the proportion of *T. melanosporum*, dark grey the proportion of *T. aestivum* and light grey the proportion of *T. mesentericum*.



References

- Baciarelli-Falini L, Rubini A, Riccioni C, Paolocci F (2006) Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T-melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza* 16 (7):475-484. doi:10.1007/s00572-006-0066-5
- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R (2010) A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology* 19 (22):4994-5008. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04855.x
- Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C (2003) Le specie Europee del genere *Tuber*, una revisione storica. . Museo Regionale di Scienze Naturali, Monographie XXXVII. , Regione Piemonte, Torino.
- Chevalier G (1983) Bulletin de la fédération française des producteurs de truffes , FNPT, Paris, n°6.33-50
- Chevalier G, Frochot H (1997) La truffe de Bourgogne. Levallois-Perret, France. Éditions Pétrarque
- Chevalier G, Grente J, Pollacsek A (1973) Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Annales de Phytopathologie* 5:107-108
- De Mendiburu F (2012) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.1-3. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A (2003) Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21 (10):433-438. doi:10.1016/s0167-7799(03)00204-x
- Højsgaard S, Halekoh U, Robison-Cox J, Wright K, Leidi A (2012) doBy: doBy - Groupwise summary statistics, general linear contrasts, population means (least-squares-means), and other utilities. R package version 4.5-5. <http://CRAN.R-project.org/package=doBy>.
- Jeandroz S, Murat C, Wang YJ, Bonfante P, Le Tacon F (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the 'true truffles'. *Journal of Biogeography* 35 (5):815-829. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01851.x
- Molinier V, Murat C, Morin E, Gollotte A, Wipf D, Martin F (2013) First Identification of Polymorphic Microsatellite Markers in the Burgundy Truffle, *Tuber aestivum* (Tuberaceae). *Applications in Plant Sciences* 1 (2):1200220. doi:10.3732/apps.1200220
- Palenzona M (1969) Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semanzali di *Corylus avellana* L. . *Allionia* 15:121-131
- Pebesma EJ, Bivand RS (2005) Classes and methods for spatial data in R. *R News* 5 (2), <http://cran.r-project.org/doc/Rnews/>.
- Ricard JM (2003) « La truffe, guide technique » Editions du Ctifl.
- Riousset L, Riousset G, Chevalier G, Bardet MC (2001) Truffes d'Europe et de Chine. INRA Editions, Paris, France
- Song MS, Cao JZ, Yao YJ (2005) Occurrence of *Tuber aestivum* in China. *Mycotaxon* 91:75-80
- Turgeman T, Sitrit Y, Danai O, Luzzati Y, Bustan A, Roth-Bejerano N, Kagan-Zur V, Masaphy S (2012) Introduced *Tuber aestivum* replacing introduced *Tuber melanosporum*: a case study. *Agroforestry Systems* 84 (3):337-343. doi:10.1007/s10457-011-9478-0
- Vellinga E, Wolfe B, Pringle A (2009) Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181:960-971.
- Wickham H (2009) ggplot2 : elegant graphics for data analysis. Springer, New York.

Discussion générale, Conclusion et Perspectives



Discussion générale

Tour à tour « Diamant de la Cuisine », « Pomme féérique », « Gemme des Terres pauvres », « Perle noire », « Fruit de l'interaction entre la foudre et les pluies d'automne », « Ingrédient aphrodisiaque » ou même « Fruit démoniaque », la truffe fait rêver et saliver.

A ce jour, on dénombre **180 espèces truffières** à travers le monde (Bonito et al. 2010b). **Les espèces les plus étudiées sont celles qui ont une valeur gastronomique et marchande** telles que *Tuber melanosporum*, *Tuber borchii*, *Tuber brumale*, *Tuber mesentericum*, *Tuber indicum*, *Tuber magnatum* et *Tuber aestivum*.

D'un point de vue biologique, de par ses intérêts gastronomiques et commerciaux, c'est un modèle pas tout à fait comme les autres. Beaucoup d'études se sont intéressées à **l'identification des espèces de truffes** (Chen et al. 2011; Dupré et al. 1985; Gandeboeuf et al. 1994; Gandeboeuf et al. 1997; Henrion et al. 1994; Iotti et al. 2007; Iotti et al. 2002; Mello et al. 2002; Paolocci et al. 2004), à **leur culture** (Bertault et al. 2001; Chevalier and Frochot 1987; Dupré 1997; Frochot et al. 1990; Hall et al. 2003; Olivier 2000; Pruett et al. 2008; Ricard 2003) et à **leurs propriétés aromatiques** (Bellesia et al. 2001; Buzzini et al. 2005; Diaz et al. 2009; Diaz et al. 2003; Diaz et al. 2002; Gioacchini et al. 2005; Gioacchini et al. 2008; March et al. 2006; Mauriello et al. 2004; Splivallo et al. 2007; Splivallo et al. 2011; Splivallo et al. 2012; Talou et al. 1987, 1989a, b; Talou et al. 1990).

Cependant, aussi bien globalement que pour une espèce en particulier, il est à noter que de nombreuses inconnues subsistent concernant leurs positions taxonomiques, leurs biologies ou encore leurs propriétés aromatiques. **Il reste donc de nombreux points à éclaircir.**

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au modèle ***Tuber aestivum-uncinatum***. Ce taxon, comme nous l'avons vu, correspond à la truffe **la plus commune en Europe**. Elle possède un intérêt culturel, gastronomique et commercial important que ce soit en France ou en Europe. Cependant, au début de ce travail de thèse la question de savoir si la truffe de Bourgogne était une espèce à part de la truffe d'été ou la même espèce était toujours posée. De plus, ce taxon ayant une large aire de répartition, cela laissait présager de possibles différenciations entre populations. Cependant, aucune étude de structuration génétique n'avait été effectuée à grand échelle. A l'échelle plus locale, un des buts de ce travail était d'étudier la variabilité aromatique et génétique existante.

A. *Tuber aestivum/uncinatum* : Dr Jekyll & Mr Hyde ?

L'emploi de 9 marqueurs génétiques couramment employé à l'échelle interspécifique fongique (Bonito et al. 2010a; Bonito et al. 2010b; Gardes and Bruns 1993; Hansen et al. 2005; Jeandroz et al. 2008; Larsson and Jeppson 2008; Matheny 2005; Paolocci et al. 2004; Roux et al. 1999; Spatafora et al. 2006; Stockinger et al. 2009; Wang et al. 2006) a permis de confirmer la conspécificité de *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* (article 1) (Molinier et al. submitted). Plusieurs études précédentes avaient conclu que *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* appartenaient à la même espèce (Paolocci et al. 2004; Weden et al. 2005), contredisant de ce fait les résultats de Mello et collaborateurs (Mello et al. 2002). Ces trois dernières études n'avaient employé que peu de marqueurs et ce sur un échantillonnage assez réduit. Nous avons donc décidé de mener une analyse phylogénétique plus complète avec 9 marqueurs différents couramment employés (nucléaires ou mitochondriaux ; codants ou non-codants), sur des échantillons provenant de diverses localisations de l'aire de

répartition de l'espèce. De plus, nous avons employé les méthodes de reconstruction phylogénétiques probabilistes (Maximum de vraisemblance et Inférence bayésienne) qui sont reconnues plus robustes que les approches de Neighbour-joining et l'UPGMA employées dans les études précédentes. Ces analyses ont permis de confirmer la conspécificité de *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* (article 1) (Molinier et al. submitted). D'un point de vue nomenclature, *Tuber aestivum* ayant été décrite avant *Tuber uncinatum*, le nom « *Tuber aestivum* » a la priorité. Lors de cette étude, avons de plus pu mettre en évidence un certain polymorphisme génétique au sein de l'espèce

Récemment, les techniques, nouvelles générations, de séquençage ont permis de développer des marqueurs microsatellites pour des espèces non-modèles, rapidement et à moindre cout (Abdelkrim et al. 2009; Csencsics et al. 2010; Perry and Rowe 2011). La technique de pyroséquençage direct à partir d'extrait d'ADN génomique a permis le développement de marqueurs microsatellites chez les plantes et animaux (Abbott et al. 2010; Abdelkrim et al. 2009; Allentoft et al. 2009; Boomer and Stow 2010; Buehler et al. 2011; Carvalho and Beheregaray 2011; Castoe et al. 2010; Clarke et al. 2010; Clay et al. 2010; Csencsics et al. 2010; Green et al. 2011; Hale et al. 2010; Lee et al. 2009; Lepais and Bacles 2011; Magain et al. 2010; Metzger et al. 2011; Perry and Rowe 2011; Rasmussen and Noor 2009; Saarinen and Austin 2010; Sexton et al. 2010; Somme et al. 2012; Tangphatsornruang et al. 2009; Todd et al. 2011; Vanpe et al. 2009; Vargas et al. 2011). A notre connaissance c'est la première fois que des amorces SSR sont développées via cette technique chez un champignon ectomycorhizien. Le développement de marqueurs SSR sur espèces non-modèles se fait donc de plus en plus facilement. Cependant, on peut noter une augmentation croissante de l'utilisation des SNP au lieu des SSR (Guichoux et al. 2011). On peut envisager dans un futur très proche la généralisation de l'utilisation des SNP pour des études de

génétiques de populations et de structuration génétique. Le polymorphisme observé lors de l'étude phylogénétique de *Tuber aestivum* a pu être confirmé lors du développement de marqueurs microsatellites (article 3) (Molinier et al. 2013). En effet, nous avons pu développer, grâce à la technique du pyroséquençage direct, et ce, à partir seulement d'un ascocarpe et d'un ½ run contenant 150µg d'ADN génomique 15 marqueurs microsatellites spécifiques qui se sont avérés tous polymorphes sur les 7 populations testées.

Ces marqueurs employés sur un plus grand échantillonnage (174 corps fructifères) se sont là aussi avérés être polymorphes présentant de 5 à 21 allèles (article 4) (Molinier et al. in prep.). Le nombre d'allèles trouvé chez *Tuber aestivum* est tout à fait similaire avec le nombre d'allèles trouvé chez d'autres espèces de truffes telles que *Tuber magnatum* et *Tuber melanosporum* (Murat et al. 2011; Rubini et al. 2004). En combinant les marqueurs SSR, nous avons pu identifier, sur les 174 ascocarpes, 144 génotypes multilocus (MLG). De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence le partage de MLG entre des individus appartenant à des populations géographiques éloignées et aussi à des morphotypes (*aestivum-uncinatum*) différents. Même si on ne peut pas exclure qu'une augmentation du nombre de marqueurs SSR pourrait permettre l'obtention de profils MLG différents, on peut envisager avec ces résultats une dispersion de genets de *Tuber aestivum* à travers l'Europe. Ce premier résultat nous a encouragés à nous questionner sur la structuration génétique de nos échantillons et sur l'éventuelle existence de sous-populations. Les analyses de structuration génétique ont permis de souligner l'existence de 4 sous populations différenciées et par là même de mettre en évidence pour la première fois l'existence d'écotypes au sein de l'espèce (Molinier et al. in prep.)(article 4). Les 4 sous populations présentent des indices de fixation F_{st} entre

elles qui vont de 0.39 à 0.53. Selon Wright en 1978, cela indique un très fort taux de différenciation entre populations (Wright 1978). Cependant, les 4 clusters ne correspondent pas à des groupes géographiques. Donc de manière intéressante, au sein d'un même groupe géographique plusieurs clusters différenciés cohabitent. Cela suggère que certains individus d'une même localité n'échangent pas de gènes. Ceci a déjà été trouvé chez *Laccaria amethystina* récemment (Vincenot et al. 2012). En l'absence de barrières géographiques, cela peut être dû à des barrières génétiques ou écologiques. Cependant, le manque d'information à propos de l'écologie du site de récolte ne nous permet pas de pousser les analyses. Il serait intéressant, dans un futur proche, d'effectuer le même type d'analyses avec l'emploi de ces marqueurs microsatellites sur des populations encore plus nombreuses et bien définies quant à leur écologie. L'échantillonnage de *Tuber aestivum* reste un des points centraux et sensibles de ce travail de thèse. En effet, de par sa nature (champignon hypogé devant s'échantillonner au chien) et de par sa valeur commerciale, il n'est pas facile d'effectuer un échantillonnage exhaustif et complet. Cela mettrait peut être en évidence des barrières écologiques. De plus, cela nous permettrait de comprendre quels phénomènes rentrent en jeu quant à la structuration génétique de l'espèce.

Le fait de retrouver dans des clusters différenciés des morphotypes *aestivum* et *uncinatum* montre clairement que les critères morphologiques jusqu'à présent utilisés (Chevalier 1983; Chevalier et al. 1979) ne sont pas fiables. Cela conforte d'autant plus les résultats de notre étude phylogénétique. Cependant, comme nous l'avons vu le cluster 3, regroupe essentiellement des individus du Sud-est de la France et de morphotype « *aestivum* ». C'est d'ailleurs le cluster le plus différencié. De plus, nous retrouvons au sein de ce cluster de façon unique, des allèles particuliers pour certains marqueurs. Cette spécificité génétique reste à être confirmée par un échantillonnage

plus important. Cependant, tous ces résultats suggèrent l'existence d'un écotype particulier correspondant à *Tuber aestivum sensu stricto*. L'existence de cet écotype avait déjà été suggéré mais sans réelle démonstration (Le Tacon, 2011). Cet écotype, selon les trufficulteurs, est limité, tout comme *Tuber melanosporum*, aux régions du Sud à forêts ouvertes.

B. Importance de la mise en place d'études à l'échelle locale pour mieux comprendre la biologie de *Tuber aestivum*.

La variabilité génétique et aromatique entre deux saisons de récoltes au sein d'une même truffière n'avait encore jamais été étudiée pour *Tuber aestivum*. Nous avons montré, lors de nos analyses impliquant l'utilisation de marqueurs SSR, une certaine stabilité génétique entre deux années pour une truffière plantée. Un résultat similaire avait été obtenu en 2012 au sein d'une truffière suisse par l'emploi de marqueurs AFLP (Splivallo et al. 2012). Cela suggère que les génotypes colonisant les racines des arbres hôtes et qui sont responsable de la plus grande partie de la production de corps fructifères sont persistants au moins sur deux saisons. L'analyse des profils génétiques sur plusieurs années consécutives pourraient confirmer ces résultats préliminaires.

D'un point de vue aromatique, nous avons montré une différenciation modérée entre une truffière dite naturelle et une autre plantée. En analysant les composés organiques volatils entrant en jeu dans la variabilité inter-truffières et inter-saisons, nous avons pu confirmer le rôle prédominant des composés C8. Nos résultats confirment que ces derniers sont génotypes dépendants. Ce résultats avait été mis préalablement en évidence en 2012 par Splivallo et collaborateurs (Splivallo et al. 2012). Il est à noter que Splivallo et collaborateurs avaient employé la méthode

SPME GC-MS fingerprint qui ne leur permettait pas de séparer les composés isolés. Notre but ici était d'employer une analyse plus fine afin de pouvoir les discriminer et voir si d'autres composés organiques volatils étaient dépendants du génotype. De manière intéressante, cela n'a été le cas pour aucun des composés mis en évidence, excepté pour 3 composés C8, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one et 3-octanol). Or, très récemment, il a été souligné que la concentration en ces trois composés était augmentée lors de la congélation des corps fructifères de *Tuber melanosporum* (Cullere et al. 2013). On peut donc se demander si dans notre analyse, il n'y aurait pas un biais technique dû à la congélation des corps fructifères de *Tuber aestivum*. Les échantillons ayant été tous congelés pour la même période et de la même manière, cette hypothèse peut à priori être écartée. Il sera dans le futur intéressant de travailler sur un même matériel à la fois frais et congelés pour, peut être mettre en évidence la formation *de novo* de ces composés.

Parmi les autres facteurs qui influenceraient le profil aromatique des truffes, se trouvent la maturité (Zeppa et al. 2004) (étudié sur *Tuber borchii*) et l'origine géographique (Gioacchini et al. 2008) (étudié sur *Tuber magnatum*). Cependant, il a été montré que ces deux facteurs n'auraient aucune influence sur le profil aromatique de *Tuber aestivum* (Splivallo et al. 2012). Lors de nos analyses, nous avons montré que seul le composé 2-butanone paraît lié à la maturation. Ce résultat est très sensiblement différent de celui obtenu pour *Tuber borchii* qui présentait toute une panoplie de composés dont la concentration variait selon le degré de maturité des corps fructifères (Zeppa et al. 2004). De la même manière, nous avons trouvé une différence de concentration uniquement pour le composé 1-methoxy-3-methylbenzene entre les deux différents sites d'échantillonnage. Cela, diffère là aussi de l'étude de 2008 de Gioacchini qui montrait une variabilité importante des arômes selon la

provenance géographique des corps fructifères de *Tuber magnatum*. Pour confirmer nos résultats, des analyses complémentaires, impliquant d'autres provenances géographiques seraient nécessaires. Néanmoins, nous pouvons expliquer nos résultats par certaines hypothèses. Tout d'abord, la manière dont nos échantillons ont été préparés a peut être été différente de celle effectuée dans les autres études. En effet, nous avons brossé et lavé les truffes avant congélation alors que pour les autres études cela n'a pas été mentionné (Gioacchini et al. 2008; Zeppa et al. 2004). Or, il a été mis en évidence que la congélation et le lavage des corps fructifères pourraient influencer les populations microbiennes existante au sein des corps fructifères (Barbieri et al. 2005; Splivallo et al. 2011). De plus comme les agents microbiens pourraient contribuer au profil aromatiques des truffes (Buzzini et al. 2005; Splivallo et al. 2011), cela constitue une explication probable aux différences obtenues entre notre étude et les autres.

Simultanément à l'analyse ponctuelle des composés aromatiques, l'étude sur de la truffière de Daix sur une échelle temporelle longue (plus 30 ans) a été mise en place. Sur cette truffière, plantée en Côte d'Or en 1977 noisetier / *Tuber melanosporum*, la première récolte de *Tuber melanosporum* ayant eu lieu 4 ans après plantation, nous avons pu confirmer la possibilité d'implantation de *Tuber melanosporum* en Bourgogne et le succès de la technique d'inoculation employée (Chevalier 1983). Nous avons pu mettre en évidence des fluctuations de production selon les années et selon les arbres. L'ajout d'informations météorologiques pourrait nous aider à comprendre les causes de telles fluctuations. En effet, il a été montré que les changements météorologiques saisonniers influenceraient la distribution des champignons ectomycorhiziens (Courty et al. 2008). Lors de cette étude, nous avons montré que *Tuber melanosporum* avait été remplacé partiellement puis complètement

par *Tuber aestivum* en une période de trois ans seulement. Un tel phénomène de remplacement ou du moins d'apparition d'autres espèces de truffes différentes de celle inoculée initialement a été précédemment montré (Baciarelli-Falini et al. 2006; Turgeman et al. 2012; Vellinga et al. 2009). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer un tel changement rapide au sein de la truffière de Daix, cependant, la fermeture de la canopée des noisetiers semble être la cause principale. Cette cause a d'ailleurs déjà été mise en évidence pour *Tuber melanosporum* dans une autre truffière (Ricard 2003). Cependant, une étude récente effectuée sur *Tuber melanosporum* a montré que l'ouverture de la canopée ne permettait pas une stimulation de la production et que la sécheresse serait plus un moteur (Garcia-Barreda and Reyna 2012). N'ayant pas les relevés météorologiques détaillés, nous ne pouvons pas exclure des changements brutaux environnementaux (précipitations, sécheresse...) qui seraient alors à l'origine du glissement entre les deux espèces. Enfin, il est intéressant de souligner que dans une étude récente effectuée en Nouvelle-Zélande, la présence de *Tuber melanosporum* a persisté bien que certaines autres espèces apparaissaient (Guerin-Laguette et al. 2013). Cependant, dans cette étude, les analyses se sont effectuées par examen des pointes mycorhizées. De ce fait, n'ayant fait les analyses pour notre part que sur la production de corps fructifères, nous pourrions émettre l'hypothèse que *Tuber melanosporum* ne serait plus productive mais subsisterait sous la forme d'ectomycorhizes. En d'autres termes, l'analyse des ectomycorhizes présentes au sein du site de Daix pourraient nous montrer que *Tuber aestivum* est bien présente et produit des fructifications alors que *Tuber melanosporum*, bien que non produisante est aussi présente sous forme d'ectomycorhizes. De plus, afin de mieux comprendre comment *Tuber melanosporum* a été remplacé par *Tuber aestivum*, nous réalisons actuellement une étude spatiale de l'apparition de *Tuber aestivum* sur carte en

fonction des arbres concernés. Cela va, sans doute, nous renseigner sur la dynamique spatiale qui a eu lieu au sein de la truffière : Est-ce parti spécifiquement d'un seul endroit de la truffière ? Au contraire, l'apparition de *Tuber aestivum* a-t-elle eu lieu simultanément à différents endroits ?

Ces études faites à l'échelle locale présentent donc l'avantage d'être encadrées, les différents paramètres étant connus ou du moins assez facilement accessibles.

C. Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de clarifier le statut taxonomique de *Tuber aestivum* et donc de confirmer que *Tuber aestivum* et *Tuber uncinatum* sont une seule et même espèce. Dans un deuxième temps, pour étudier la structuration génétique de l'espèce, nous avons réussi à développer 15 marqueurs microsatellites polymorphes via la technique de pyroséquençage direct. L'utilisation de ces marqueurs à l'échelle européenne nous a permis de mettre en évidence pour la première fois l'existence d'écotypes et notamment l'écotype *Tuber aestivum sensu stricto*. A une échelle plus restreinte, nous avons confirmé le rôle important des composés aromatiques C8. Enfin, toujours à échelle locale, nous avons pu mettre en évidence des fluctuations de production au sein d'une truffière en fonction des années et des arbres. Grâce à ces analyses de données, nous avons aussi mis en évidence un remplacement rapide de *Tuber melanosporum* par *Tuber aestivum*.

En définitive, ce travail a permis de mieux comprendre à grande échelle et à échelle locale la dynamique de *Tuber aestivum*. Il a aussi permis de mettre en place à la fois des outils et des collaborations qui seront un atout dans un futur proche pour approfondir les connaissances sur la truffe de Bourgogne.

D. Perspectives

Perspectives à grande échelle

L'étude de structuration génétique à l'échelle européenne n'était que préliminaire. Il serait aussi intéressant d'étudier à partir de populations d'intérêt si *Tuber aestivum* a suivi les mêmes routes de recolonisations postglaciaires que *Tuber melanosporum* ou *Tuber magnatum* par exemple (Murat et al. 2004; Rubini et al. 2005). En effet, nous avons pu démontrer l'existence d'écotypes au sein de l'espèce mais nous n'en connaissons pas les causes. La sous-population 3 (cluster 3) par exemple, est-elle une traduction d'un effet fondateur ? Inférer l'histoire évolutive de *Tuber aestivum* constitue un important sujet de recherche mais qui pourrait fournir de nouvelles pistes et informations.

De plus, la mise en évidence d'allèles rares au sein de l'écotype *Tuber aestivum sensu stricto* nous donne comme perspective d'établir un profil SSR détaillé pour cet écotype afin peut être de mettre en place un outil de détection rapide pour caractériser cet écotype.

Perspectives à l'échelle locale

Nous avons étudié, via l'utilisation de marqueurs microsatellites et d'analyses d'arômes, la variabilité génétique et aromatique des truffes récoltées dans la truffière de Daix. Il serait intéressant d'y coupler des données « mating –type » ainsi que la distribution des génotypes de *T. aestivum* au niveau des ectomycorhizes formées par les arbres. En effet, il a été mis en évidence très récemment grâce au séquençage de génome de *Tuber melanosporum* (Martin et al. 2010) que cette espèce était hétérothallique (Martin et al. 2010; Riccioni et al. 2008; Rubini et al. 2011a; Rubini et al. 2011b). A partir de ce résultat, le locus MAT (mating-type) a pu faire l'objet de

développement d'amorces amplifiant soit l'allèle MAT-1-1 soit MAT1-2. Une étude très récente vient d'utiliser ces marqueurs pour caractériser la répartition de *Tuber melanosporum* au sein d'une truffière (Murat et al. 2013). Il a notamment été mis en évidence que la distribution des mating-type opposés ne se faisait pas au hasard, qu'il y avait isolement par distance sur de courtes distances et que de mêmes genets se retrouvaient sur les mêmes arbres hôtes. En se basant, sur cette stratégie, il serait intéressant d'effectuer le même type d'analyses (en utilisant les gènes sexuels MAT) pour *Tuber aestivum*. Des premières séquences du génome de *Tuber aestivum* ont été utilisées pour identifier par comparaison avec celles disponibles de *Tuber melanosporum* le gène MAT. Une fois les allèles du gène MAT de *Tuber aestivum* identifiés, il sera possible de coupler, pour la truffière de Daix, des analyses SSR, des analyses aromatiques avec des analyses mating-type. Ainsi, comme nous avons la chance de pouvoir suivre une truffière dont les informations écologiques et historiques sont disponibles, l'étude de *Tuber aestivum* pourrait se faire *in situ* et balaierait différents aspects de sa biologie. De plus, *Tuber aestivum* étant une espèce relativement éloignée de *Tuber melanosporum* et ayant des caractéristiques différentes, au moins pour certaines populations, comparer leur dynamique et biologie respectives serait un point intéressant pour une meilleure compréhension de la biologie des truffes.

Mettre en place des expérimentations à une échelle locale pour des analyses *in situ* d'espèces truffières est un enjeu primordial que ce soit pour un aspect scientifique ou appliqué (trufficulture). En effet, mieux connaître la dynamique de *Tuber aestivum* pourrait donner des pistes d'améliorations en culture et à son maintien en production. Il est à noter qu'une truffière expérimentale avec différents arbres hôtes est en train de voir le jour en Côte d'Or (Leuglay). Ce qui permettra aux différents acteurs

impliqués dans le projet (trufficulteurs, scientifiques, municipalité) de suivre sur le long terme une population de *Tuber aestivum* au niveau des ectomycorhizes et des truffes. Par la suite, une autre expérimentation, impliquant des clones de chêne et/ou de noisetiers inoculés avec *T. aestivum* dans le but d'éliminer le facteur génétique de l'arbre hôte dans la compréhension de la biologie de cette truffe, verra le jour.



Annexes





Annexe 1 : Plaquette de Formation du Master 2 AE pour doctorants

Mademoiselle, Monsieur,

Vous intégrez le Master Administration des Entreprises (Master Double Compétence en Gestion) en parallèle de votre cursus de doctorat. Pour le bon déroulement de cette année, figurent ci-après pour rappel un certain nombre d'éléments.

Voici le **programme de la formation** avec les ECTS associés (et modalités de contrôle des connaissances)

UE	Discipline	Nombre d'heures	ECTS	Evaluation	total
UE 1 Comptabilité Contrôle	Comptabilité générale	20		CT	3.6
	Comptabilité de gestion	20		CT	2.7
	Contrôle de gestion	20		CT	2.7
TOTAL UE 1		60	9		9
UE 2 : Gestion des projets et des marchés	Marketing et étude de marché	20		CT	3.6
	Gestion de projet R & D	20		CC	2.4
TOTAL UE 2		40	6		6
UE 3 : Gestion des ressources humaines	Politiques de GRH	20		CT	3
	Management d'équipe	20		CC	3
TOTAL UE 3		40	6		6
UE 4 : Droit et Méthodes	Droit du travail	20		CT	2.25
	Droit des affaires	20		CT	2.25
	Droit de la propriété industrielle	20		CT	2.25
	Méthodes quantitatives	20		CT	2.25
TOTAL UE 4		80	9		9
UE 5 : Politique générale	Management stratégique	20		CT	2.34
	Théorie des organisations	20		CT	2.33
	Economie pour le manager	20		CT	2.33
TOTAL UE 5		60	7		7
UE 6 : Finance	Diagnostic financier	20		CT	2.5
	Politique financière	20		CT	2.5
TOTAL UE 6		40	5		5
UE 7 : Dimensions transverses	Système d'information	20		CT	3
	Gestion de production	20		CC	3
TOTAL UE 7		40	6		6
UE 8 : Professionnalisation	Stage			CC	9.6
	Jeu d'entreprise	15		CC	2.4
TOTAL UE 8		15	12		12

L'Equipe pédagogique du Master Administration des Entreprises :

Discipline	NOM (% du cours assuré, si différent de 100%)	Qualification
Comptabilité générale	Laurent DIDELOT	Professeur Agrégé du second degré, Université de Bourgogne, IAE
Comptabilité de gestion	Christine MARSAL	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Contrôle de gestion	Christine MARSAL	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Marketing et Etude de marché	Jean-François NOTEBAERT (60%)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IUT Dijon
Marketing et Etude de marché	Rémi MENCARELLI (40 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Gestion de projet	Philippe GINET (60 %)	Professeur Agrégé du second degré, Université de Bourgogne, AGROSUP Dijon
Gestion de projet	Jean-Pierre GRENOUILLET (40 %)	Consultant Gestion de Projet
Politiques de GRH	Séverine VENTOLINI (80 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Politiques de GRH	Samuel MERCIER (20%)	Professeur des Universités (06), Directeur de l'IAE de Dijon, Université de Bourgogne, IAE
Management d'équipe	Séverine VENTOLINI (80 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Management d'équipe	Samuel MERCIER (20%)	Professeur des Universités (06), Directeur de l'IAE de Dijon, Université de Bourgogne, IAE
Droit du travail	Nagy PAULIN-SEGUIRE	Avocat
Droit des affaires	Vincent THOMAS	Maître de conférences en Droit Privé, Université de Bourgogne, Faculté de Droit
Droit fiscal	Laurent DIDELOT	Professeur Agrégé du second degré, Université de Bourgogne, IAE
Méthodes quantitatives	Françoise BENSA	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IUT Le Creusot
Management stratégique	Nacer GASMI (60 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, UFR de STAPS
Management stratégique	Jean-Pierre PITOL-BELIN (40 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Théorie des organisations	Jean-Pierre PITOL-BELIN (60 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Théorie des organisations	Séverine VENTOLINI (40 %)	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE
Économie pour le manager	Stéphane TIZIO	Maître de conférences en Economie, Doyen de l'UFR Science Economique et Gestion, Université de Bourgogne
Diagnostic financier	Fabrice HERVE	Maître de conférences (06), Responsable du MAE, Université de Bourgogne, IAE
Politique financière	Kamel LAARADH	Maître de conférences (06), Université de Bourgogne, IAE

Système d'information	Didier FORMET (60 %)	Consultant CPAGE
Système d'information	Jérôme LORIOT (40 %)	Consultant Bull
Gestion de production	David JOANNIC (60 %)	Maître de conférences Electronique, Université de Bourgogne, IUT Auxerre
Gestion de production	Franck HENDEL (40%)	Professeur Certifié du second degré, Directeur du SUFCOB, Université de Bourgogne, IAE
Jeu d'entreprise	Patrice COTTET	Maître de conférences (06), Université de Reims

Au total, 12 semaines de l'année 2010-2011 sont concernées par la formation ; elles sont renseignées dans le fichier planning disponible sur l'ENT.

Les doctorants de l'uB bénéficient d'un rythme adapté. Les modalités d'organisation sont les suivantes : les doctorants suivront le MAE sur 3 ans (durée théorique de la thèse de doctorat). Le planning peut s'agencer de la manière suivante :

- 1^{ère} année : 2 jours consécutifs (LUNDI-MARDI) de 7 heures de cours par mois pendant 8 mois (septembre à juin sauf novembre et janvier) et 4 jours de cours (2 fois 2 jours consécutifs espacés d'au moins 1 semaine en novembre et janvier) pendant 2 mois, soit 168 heures dans l'année ;
- 2^{ème} année : 2 jours consécutifs (MERCREDI-JEUDI) de 7 heures de cours par mois pendant 8 mois (septembre à juin sauf novembre et janvier) et 4 jours de cours (2 fois 2 jours consécutifs espacés d'au moins 1 semaine en novembre et janvier) pendant 2 mois, soit 168 heures dans l'année ;
- 3^{ème} année : 1 jour (VENDREDI) de 7 heures de cours par mois pendant 8 mois (septembre à juin sauf novembre et janvier) et 2 jours de cours (2 fois 1 jour espacé d'au moins 1 semaine en novembre et janvier) pendant 2 mois, soit 84 heures dans l'année.

L'échéancier appelle les remarques suivantes :

- Le planning prévu est compatible avec une modulation du parcours : les doctorants peuvent donc suivre le diplôme sur 2 ans (3 jours, 2 jours) ou sur 1 an. Cette décision est individuelle et relève d'une concertation avec le(s) directeur(s) de recherche ;
- Pour obtenir le diplôme, les doctorants devront s'inscrire 3 fois dans le diplôme afin de suivre l'ensemble des enseignements. Il est envisageable, en accord avec le directeur de

recherche et l'école doctorale concernée, qu'un doctorant puisse aménager son parcours (suivi sur 2 ans avec 3 jours puis 2 jours de cours par exemple) ;

- Le cours d'anglais ne sera pas suivi par les étudiants : ce cours sera assuré en s'appuyant sur le Centre de Langues de l'UB (ce qui est déjà le cas dans le cadre des formations proposées par la mission doctorale) et sera validé par le passage du TOEIC avec un score minimum de 605 (situé environ au milieu du Score Vert du TOEIC : 470 – 725) ;
- Certaines matières pourront être obtenues par une validation d'acquis (contingente au domaine de recherche et aux connaissances du doctorant et sur production de documents justificatifs) ;

Remarques relatives aux stages

Le stage peut être envisagé de 2 manières :

1. Soit l'expérience doctorale est reconnue comme équivalente à un stage et donc le doctorant bénéficie d'une validation d'acquis pour l'UE 8 ;
2. Soit le doctorant effectue un stage au terme de son doctorat (une fois sa thèse soutenue) pour valider le diplôme ou il crée son entreprise et cette création lui permet de valider le stage. Cette dernière solution tend à favoriser l'insertion professionnelle des docteurs puisque typiquement les stages ouvrent des perspectives d'embauche. Enfin, la participation de PREMICE à ce projet assure la possibilité que certains doctorants voient leur recherche de stage facilitée du fait d'une mise en relation des étudiants avec les entreprises innovantes par PREMICE.

Les conventions de stage (à retirer au Bureau 126 - Mme Picot) devront être établies le plus rapidement possible ; elles devront être signées de l'entreprise et de l'Université, avant le départ en stage. Cette procédure prend un peu de temps et il est **vivement** recommandé de s'en acquitter rapidement. Par ailleurs, avec la convention de stage, il ***est nécessaire de produire une attestation d'assurance responsabilité civile.***

Le stage donnera lieu à la **rédaction** d'un rapport et à **une soutenance orale** qui devra se dérouler d'ici, au plus tard, la première semaine de septembre 2013.

Les rapports de stage, quant à eux, devront être impérativement remis au *secrétariat de l'IAE* **au plus tard une semaine avant la soutenance** en **2** exemplaires si le tuteur entreprise *participe* à la soutenance (1 rapport pour l'encadrant universitaire et 1 rapport pour la

bibliothèque de l'IAE (sauf en cas de souci de confidentialité)) et en **3** exemplaires si le tuteur entreprise *ne participe pas* à la soutenance (1 rapport pour l'encadrant universitaire, 1 rapport pour l'autre membre du jury et 1 rapport pour la bibliothèque de l'IAE (sauf en cas de souci de confidentialité)).

Chaque étudiant choisit un tuteur enseignant et un tuteur entreprise pour suivre son stage qui évaluent le rapport et participent à la soutenance. Il est vivement conseillé de prendre contact suffisamment tôt avec le tuteur enseignant, afin de fixer une date de soutenance qui permette à l'entreprise d'être représentée. Si toutefois, l'entreprise ne pouvait pas être représentée, il convient d'informer suffisamment tôt le tuteur enseignant, ce afin que ce dernier puisse constituer un jury en toute sérénité. *Enfin, chaque étudiant doit signaler précisément et avant le départ en stage le tuteur enseignant qu'il a choisi (à cette fin, une fiche d'homologation doit être remplie).*

La soutenance de stage pour laquelle la présence de l'entreprise est vivement recommandée donne lieu à une évaluation dont le poids est important dans l'obtention du diplôme (intitulé : Stage). L'organisation pratique de la soutenance (réservation de salle, ordinateur, vidéoprojecteur) se fait **sur l'initiative de l'étudiant** : vous réservez une salle et le matériel nécessaire auprès de Nadine Picot. Concernant la date, elle est fixée en accord avec le responsable entreprise et l'encadrant universitaire. Enfin, une **fiche d'évaluation** est à remettre à votre tuteur entreprise. Assurez-vous que cette fiche est bien transmise à l'IAE et notamment à votre encadrant universitaire, car elle est nécessaire pour établir la note finale de stage.

Enfin pour des raisons organisationnelles, une fois votre stage débuté, il vous est demandé de communiquer les informations suivantes par messagerie électronique à fabrice.herve@u-bourgogne.fr avec copie à secretariat.ae@u-bourgogne.fr

- Nom de l'entreprise et lieu de stage ;
- Thématique du stage (missions principales) ;
- Durée du stage (dates exactes) ;
- Identité du tuteur enseignant choisi ;
- Coordonnées du tuteur entreprise (nom et prénom, coordonnées téléphoniques et e-mail).

Remarque relative aux modalités de contrôle des connaissances

Le diplôme de M2 est obtenu au terme du parcours de formation si vous obtenez une moyenne supérieure à 10 sur l'ensemble des UE 1 à 8. Au cas où la moyenne générale est inférieure à 10 et, dans le cadre d'un parcours sur 2 ou 3 ans, concernant la session de rattrapage, la solution la plus adaptée consiste à repasser chaque année les matières dont la note est inférieure à 10/20 afin d'éviter de repasser un examen plusieurs années après avoir suivi le cours. Toutefois, il est possible pour les étudiants de ne pas repasser les matières dont la note est inférieure à 10/20 et ainsi tenter de bénéficier au terme de la formation du principe de compensation en vigueur dans le système LMD et à l'uB.

Enfin, en cas de validation d'acquis, les matières concernées sont neutralisées ; autrement dit, elles ne sont pas considérées dans le calcul des moyennes des UE. Pour le calcul de la moyenne sur l'ensemble des UE (pour l'obtention du diplôme), il convient toutefois de considérer les coefficients des UE.

Contacts formation

⇒ Secrétariat Master :

Dominique CHINA

☎ 03 80 39 54 20

✉ Dominique.China@u-bourgogne.fr

Bureau 128 – IAE – 1^{er} étage

⇒ Secrétariat stage :

Nadine PICOT

☎ 03 80 39 57 48

✉ Nadine.Picot@u-bourgogne.fr

Bureau 126 – IAE – 1^{er} étage

⇒ Responsable formation :

Fabrice HERVÉ

☎ 03 80 39 35 08

✉ Fabrice.Herve@u-bourgogne.fr

Bureau 402 – PEG – 4^{ème} étage

⇒ Site internet de l'IAE : <http://iae.u-bourgogne.fr>

Fabrice HERVÉ

Responsable du Master AE

Annexe 2 : Epilogue culinaire



Le Beurre de Truffe

par Martine Sbolgi-Guinet (Confrérie de la truffe de Bourgogne)

Ingrédients : 1/3 de truffe de Bourgogne pour 2/3 de beurre demi-sel.

Réalisation : Il suffit de malaxer le beurre à la fourchette, avec la truffe débitée en "caviar" (petits morceaux). Pas de mixeur svp. Mise en contact avant utilisation : 24 heures au frais dans un récipient hermétique. S'utilise en accompagnement avec le plateau de fromage, sur toasts grillés pour accompagner le carpaccio de saumon, la purée de pommes de terre...

Cette recette a l'avantage de pouvoir être utilisée fraîche, mais elle peut aussi se conserver au congélateur, comme vous le faites pour le beurre d'escargot. Il suffit de former un boudin que vous emballerez dans un film alimentaire. Vous ne sortirez, le moment venu, que ce que vous comptez utiliser. Conservation : frais, 3 ou 4 jours. Congélation : jusqu'à la saison suivante.

Feuilletés à la truffe de Bourgogne

par Françoise Lavier (Association de la Truffe Côte d'Orient)

Ingrédients: Un morceau de truffe de Bourgogne fraîche de la grosseur d'une grosse noisette, un petit morceau de pancetta, un morceau de pâte feuilletée et un jaune d'œuf.

Réalisation : Rouler la truffe dans la pancetta, puis dans la pâte feuilletée, dorer avec le jaune d'œuf. Répéter l'opération afin d'obtenir plusieurs petits feuilletés pour l'apéritif. Cuire 12 à 15 min sur 170°. Servir à l'apéritif.

Filet de bœuf flambé à la sauce crème de truffe

(Recette de la Confrérie de Bourgogne)

Ingrédients : Une tranche épaisse de filet par personne, 10 cl de Cognac truffé, 3 à 5 g de truffes de Bourgogne en morceaux fraîches ou congelées, 50 cl de crème, un peu de matière grasse, sel et poivre.

Réalisation: Juste avant de faire cuire la viande, faire réduire la crème puis ajouter et laisser infuser les truffes en morceaux. Saler et poivrer les tranches de bœuf. Les faire cuire dans la poêle chaude. Faire chauffer l'alcool de truffe et le faire flamber sur la viande puis finir la cuisson de la viande comme vous l'aimez. Servir la viande en l'accompagnant de pommes de terre arrosées de crème truffée, arroser la viande des sucs de cuisson.

Langres à la Truffe de Bourgogne

par Christine Dupaty (Association de la truffe Côte d'Orient)

A préparer la veille ou le matin de très bonne heure.

Ingrédients : Un Fromage « Langres », 2 truffes de Bourgogne, Crème fleurette

Réalisation : Evider l'intérieur d'un Langres avec une petite cuillère, en laissant une petite épaisseur au fond et sur les côtés. Couper une truffe en rondelles pour le décor du dessus. Couper la seconde truffe en julienne pour la farce. Mélanger la cuillère à café de crème fleurette avec l'intérieur du Langres. Ajouter la truffe en julienne, et en faire un mélange homogène. Remplir le Langres de cette préparation en formant un léger dôme. Disposer la truffe en rondelles sur le dessus du fromage. Mettre dans du cellofrais au réfrigérateur.

Références bibliographiques



- Abbott C, Ebert D, Tabata A, Therriault T (2010) Twelve microsatellite markers in the invasive tunicate, *Didemnum vexillum*, isolated from low genome coverage 454 pyrosequencing reads. *Conservation Genetics Resources*:1-3
- Abdelkrim J, Robertson B, Stanton JA, Gemmell N (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46 (3):185-192
- Agerer R (2002) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Schwäbisch Gmünd : Einhorn-Verlag.
- Allentoft M, Schuster SC, Holdaway R, Hale M, McLay E, Oskam C, Gilbert MT, Spencer P, Willerslev E, Bunce M (2009) Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *BioTechniques* 46 (3):195-200
- Anderson JB, Ullrich RC (1978) Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia* 71:402–414
- Andersson L (1990) The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon* 39:375–382
- Arango CP, Wheeler WC (2007) Phylogeny of the sea spiders (Arthropoda, Pycnogonida) based on direct optimization of six loci and morphology. *Cladistics* 23 (3):255-293. doi:10.1111/j.1096-0031.2007.00143.x
- Armour JAL, Neumann R, Gobert S, Jeffreys AJ (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3 (4):599-605. doi:10.1093/hmg/3.4.599
- Arthur CL, Pawliszyn J (1990) Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62 (19):2145-2148. doi:10.1021/ac00218a019
- Avise J, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel J, Reeb C, Saunders N (1987) Intraspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522
- Avise J, Giblin-Davidson G, Laerm J, Patton JC, Lansman R (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:6694-6698
- Avise JC (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36 (1):3-15. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- Avise JC, Ball RMJ (1990) Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7:45–67
- Baciarelli-Falini L, Rubini A, Riccioni C, Paolocci F (2006) Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T-melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza* 16 (7):475-484. doi:10.1007/s00572-006-0066-5
- Balch WE, Magrum LJ, Fox GE, Wolfe RS, Woese CR (1977) Ancient divergence among Bacteria. *Journal of Molecular Evolution* 9 (4):305-311. doi:10.1007/bf01796092
- Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16 (18):3759-3767. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x

- Barbieri E, Bertini L, Rossi I, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guidi C, Zambonelli A, Stocchi V (2005) New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. Fems Microbiology Letters 247 (1):23-35. doi:10.1016/j.femsle.2005.04.027
- Baum DA, Shaw KL (1995) Genealogical perspectives on the species problem. Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. Missouri Botanical Garden, St. Louis
- Bayes M, Price M (1763) An Essay towards Solving a Problem in the Doctrine of Chances. By the Late Rev. Mr. Bayes, F. R. S. Communicated by Mr. Price, in a Letter to John Canton, A. M. F. R. S. Philosophical Transactions 53:370-418. doi:10.1098/rstl.1763.0053
- Beheregaray L (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. Molecular Ecology 17:3754-3774
- Bellesia F, Pinetti A, Tirillini B, Bianchi A (2001) Temperature-dependent evolution of volatile organic compounds in *Tuber borchii* from Italy. Flavour and Fragrance Journal 16 (1):1-6
- Berbee ML, Taylor J (2001) Fungal molecular evolution : gene trees and geologic time. The Mycota:229-245
- Berbee ML, Taylor JW (2010) Dating the molecular clock in fungi – how close are we? Fungal Biology Reviews 24 (1-2):1-16
- Bertault G, Roussett F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M (2001) Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. Heredity 86:451-458. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00855.x
- Black WC, Baer CF, Antolin MF, DuTeau NM (2001) Population genomics: Genome-wide sampling of insect populations. Annual Review of Entomology 46:441-469. doi:10.1146/annurev.ento.46.1.441
- Blackwell M (2011) The Fungi : 1,2,3...5.1 million species ? American Journal of Botany 98 (3):426-438. doi:10.3732/ajb.1000298
- Bon M (2004) Champignons de France et d'Europe occidentale. Flammarion edn.,
- Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nature Communications 1. doi:4810.1038/ncomms1046
- Bonhomme M, Cuartero S, Blancher A, Crouau-roy B (2009) Assessing Natural Introgression in 2 Biomedical Model Species, the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) and the Long-Tailed Macaque (*Macaca fascicularis*). Journal of Heredity 100 (2):158-169. doi:10.1093/jhered/esn093
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. Molecular Ecology 13:3261-3273
- Bonito G (2009) Systematics and Ecology of Truffles (Tuber). Duke University, Durham
- Bonito G, Smith M, Nowak M, Healy R, Guevara G, Cázares E, Kinoshita A, Nouhra E, Domínguez L, Tedersoo L, Murat C, Wang Y, Moreno B, Pfister D, Nara K, Zambonelli A, Trappe J, Vilgalys R (2013) Phylogeography and diversification of truffles in the *Tuberaceae* and its newly identified sister lineage. PLoS ONE

- Bonito G, Trappe JM, Rawlinson P, Vilgalys R (2010a) Improved resolution of major clades within *Tuber* and taxonomy of species within the *Tuber gibbosum* complex. *Mycologia* 102 (5):1042-1057. doi:10.3852/09-213
- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R (2010b) A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal. *Molecular Ecology* 19 (22):4994-5008. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04855.x
- Boomer J, Stow A (2010) Rapid isolation of the first set of polymorphic microsatellite loci from the Australian gummy shark, *Mustelus antarcticus* and their utility across divergent shark taxa. *Conservation Genetics Resources* 2 (0):393-395
- Brillat-Savarin JA (1825) *Physiologie du goût*.
- Brown JM, ElDabaje R (2009) PuMA: Bayesian analysis of partitioned (and unpartitioned) model adequacy. *Bioinformatics* 25 (4):537-538. doi:10.1093/bioinformatics/btn651
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320 (1-2):37-77. doi:10.1007/s11104-008-9877-9
- Buehler D, Graf R, Holderegger R, Gugerli F (2011) Using the 454 pyrosequencing-based technique in the development of nuclear microsatellite loci in the alpine plant *Arabis alpina* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany* 98 (5):E103-E105. doi:10.3732/ajb.1000488
- Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R (2000) Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *Fems Microbiology Reviews* 24 (5):601-614. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00561.x
- Buzzini P, Gasparetti C, Turchetti B, Cramarossa MR, Vaughan-Martini A, Martini A, Pagnoni UM, Forti L (2005) Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Archives of Microbiology* 184 (3):187-193. doi:10.1007/s00203-005-0043-y
- Callot G (1999) *La Truffe, La Terre, la Vie*. INRA, Paris, 210p
- Carvalho DC, Beheregaray LB (2011) Rapid development of microsatellites for the endangered Neotropical catfish *Conorhynchus conirostris* using a modest amount of 454 shot-gun pyrosequencing. *Conservation Genetics Resources* 3 (2):373-375. doi:10.1007/s12686-010-9365-4
- Castoe TA, Poole AW, Gu WJ, de Koning APJ, Daza JM, Smith EN, Pollock DD (2010) Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources* 10 (2):341-347. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02750.x
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73 (3):203-266. doi:10.1017/s0006323198005167
- Cavalier-Smith T (2004) Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271 (1545):1251-1262. doi:10.1098/rspb.2004.2705

- Cavallis L, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis models and estimation procedures. American Journal of Human Genetics 19 (3P1):233-&
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D, Botton B (2002) An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. Plant and Soil 244 (1-2):165-175. doi:10.1023/a:1020240709543
- Chatin A (1887) Une nouvelle espèce de truffe. Les comptes rendus de l'académie des sciences 104:1132-1135
- Chatton E (1937) Titres et travaux scientifiques. Sette, Sottano, Italy
- Cheddadi R, Vendramin G, Litt T, François L, Kageyama M, Lorentz S, Laurent J-M, De Beaulieu J-L, Sadori L, Jost A, Lunt D (2006) Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. Global Ecology and Biogeography 15:271-282
- Chen JA, Guo SX, Liu PG (2011) Species Recognition and Cryptic Species in the *Tuber indicum* Complex. PLoS ONE 6 (1). doi:e14625
10.1371/journal.pone.0014625
- Chevalier G (1979) L' espèce *Tuber aestivum* Vitt. : II. Ecologie. Mushroom Science X (Part 1) 977-993
- Chevalier G (1983) Bulletin de la fédération française des producteurs de truffes , FNPT, Paris, n°6.33-50
- Chevalier G, Desmas C, Frochot H, Rioussat L (1979) L' espèce *Tuber aestivum* Vitt. : I. Définition. Mushroom Science X (Part 1) 957-975
- Chevalier G, Frochot H (1987) Ecologie et possibilité de culture en Europe de la Truffe de Bourgogne. Revue des Sciences Naturelles d'Auvergne 53:17-26
- Chevalier G, Frochot H (2002) La truffe de Bourgogne. Editions Pétrarque, Levallois-Perret, France
- Chevalier G, Grente J (1973) Propagation de la mycorhization par la truffe à partir de racines excisées et de plants inséminateurs. Annales de Phytopathologie 5:317-318
- Chevalier G, Grente J (1979) Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne: production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe. Mushroom Science 10:483-505
- Chevalier G, Grente J, Pollacsek A (1973) Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. Annales de Phytopathologie 5:107-108
- Cifarelli RA, Gallitelli M, Cellini F (1995) Random amplified hybridization microsatellites (RAHM) - isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones Nucleic Acids Research 23 (18):3802-3803. doi:10.1093/nar/23.18.3802
- Clarke L, Mackay D, Whalen M (2010) Isolation of microsatellites from *Baumea juncea* (Cyperaceae). Conservation Genetics Resources:1-3
- Claus R, Hoppen HO, Karg H (1981) The secret of truffles : a steroidal pheromone ? Experientia 37 (11):1178-1179. doi:10.1007/bf01989905

- Clay C, Gleeson D, Howitt R, Lawrence H, Abdelkrim J, Gemmell N (2010) Characterisation of microsatellite markers for the primitive New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. Conservation Genetics Resources 2 (0):301-303
- Coope G (1979) Late cenozoic fossil coleoptera: evolution, biogeography and ecology. Annual Review of Ecology and Systematics 10:247-267
- Copeland HF (1956) The classification of lower organisms. Pacific Books, Palo Alto
- Courtecuisse R (2007) Guide des champignons de France et d'Europe. Delachaux et Niestlé edn.,
- Courtois R, Bernatchez L, Ouellet JP, Breton L (2003) Significance of caribou (*Rangifer tarandus*) ecotypes from a molecular genetics viewpoint. Conservation Genetics 4 (3):393-404. doi:10.1023/a:1024033500799
- Courty PE, Franc A, Pierrat JC, Garbaye J (2008) Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. Applied and Environmental Microbiology 74 (18):5792-5801. doi:10.1128/aem.01592-08
- Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. Current Ornithology 1:159-187
- Csencsics D, Brodbeck S, Holderegger R (2010) Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. Journal of Heredity. doi:10.1093/jhered/esq069
- Cullere L, Ferreira V, Chevret B, Venturini ME, Sanchez-Gimeno AC, Blanco D (2010) Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry. Food Chemistry 122 (1):300-306. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.024
- Cullere L, Ferreira V, Venturini ME, Marco P, Blanco D (2013) Chemical and sensory effects of the freezing process on the aroma profile of black truffles (*Tuber melanosporum*). Food Chemistry 136 (2):518-525. doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.030
- Daehler CC, Anttila CK, Ayres DR, Strong DR, Bailey JP (1999) Evolution of a new ecotype of *Spartina alterniflora* (Poaceae) in San Francisco Bay, California, USA. American Journal of Botany 86 (4):543-546. doi:10.2307/2656815
- De Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. Species and speciation. Oxford University Press, New York.
- De Queiroz K (2007) Species Concepts and Species Delimitation. Systematic Biology 56 (6):879 - 886
- Debout GDG, Lhuillier E, Male PJG, Pujol B, Thebaud C (2012) Development and characterization of 24 polymorphic microsatellite loci in two *Antirrhinum majus* subspecies (Plantaginaceae) using pyrosequencing technology. Conservation Genetics Resources 4 (1):75-79. doi:10.1007/s12686-011-9478-4
- Dépraz A, Cordellier M, Hausser J, Pfenninger M (2008) Postglacial recolonization at a snail's pace (*Trochulus villosus*): confronting competing refugia hypotheses using model selection. Molecular Ecology 17:2449-2462

- Diaz P, Ibanez E, Reglero G, Senorans FJ (2009) Optimization of summer truffle aroma analysis by SPME: Comparison of extraction with different polarity fibres. *Lwt-Food Science and Technology* 42 (7):1253-1259
- Diaz P, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G (2003) Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 1017 (1-2):207-214. doi:10.1016/j.chroma.2003.08.016
- Diaz P, Senorans FJ, Reglero G, Ibanez E (2002) Truffle aroma analysis by headspace solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22):6468-6472
- Dobzhansky T (1950) Mendelian populations and their evolution. *The American Naturalist* 84:401-418
- Dobzhansky T (1970) *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York.
- Donoghue MJ (1985) A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *The Bryologist* 88:172-181
- Du Mortier B-C (1822) *Commentationes botanicae: Observations botaniques, dédiées à la Société d'horticulture de Tournay*.
- Dupré C (1997) De nouveaux outils au service de la trufficulture. ENESAD. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur délivré par l'Etat.
- Dupré C, Chevalier G, Branlard G Caractérisation des *Tuber* par électrophorèse de leurs protéines. In: C.R. 1er Colloque national sur les technologies de purification des protéines, Paris, 1985. DPIC-INPL, pp 465-467
- Engel W, Bahr W, Schieberle P (1999) Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology* 209 (3-4):237-241
- Eriksson OE (2006) Outline of Ascomycota 2006. *Myconet* 12 : 1-82.
- Fassi B, Fontana A (1967) Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. I. Micorrize e sviluppo dei semenzali nel secondo anno. *Allionia* 13:177-186
- Felsenstein J (1973) Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic zoology* 22 (3):240-249. doi:10.2307/2412304
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences : a maximum-likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17 (6):368-376. doi:10.1007/bf01734359
- Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle,
- Fontana A, Palenzona M (1969) Sintesi micorrizica di *Tuber albidum* in coltura pura, con *Pinus strobus* e pioppo euamericano. *Allionia* 15:99-104
- Foulongne-Oriol M, Spataro C, Moinard M, Cabannes D, Callac P, Savoie JM (2012) Development of polymorphic microsatellite markers issued from pyrosequencing technology for the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. *Fems Microbiology Letters* 334 (2):119-126. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02627.x

- Frank B (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze from Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 3:128-145
- Frochot H, Chevalier G, Bardet MC (1990) Influence de la désinfection du sol et du précédent cultural sur le devenir de la mycorhization par *Tuber melanosporum* après plantation. In : Comptes rendus du 2e Congrès international sur la truffe, Spoleto, 24-28 nov. 1988 / B. Granetti, M. Bencivenga Eds.289-296
- Gabella S, Abba S, Duplessis S, Montanini B, Martin F, Bonfante P (2005) Transcript profiling reveals novel marker genes involved in fruiting body formation in *Tuber borchii*. Eukaryotic Cell 4 (9):1599-1602. doi:10.1128/ec.4.9.1599-1602.2005
- Gagneux P, Woodruff D, Boesh C (1997) Furtive mating in female chimpanzees. . Nature 387:358-359
- Gandeboeuf D, Dupré C, Chevalier G (1994) Use of isoenzyme analysis to differentiate truffles from Europe. Acta Botanica Gallica 141:455–463.
- Gandeboeuf D, Dupre C, RoeckelDrevet P, Nicolas P, Chevalier G (1997) Grouping and identification of (*Tuber*) species using RAPD markers. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 75 (1):36-45
- Garcia-Barreda S, Reyna S (2012) Below-ground ectomycorrhizal community in natural *Tuber melanosporum* truffle grounds and dynamics after canopy opening. Mycorrhiza 22 (5):361-369. doi:10.1007/s00572-011-0410-2
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2 (2):113-118
- Gioacchini AM, Menotta M, Bertini L, Rossi I, Zeppa S, Zambonelli A, Piccoli G, Stocchi V (2005) Solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry: a new method for species identification of truffles. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19 (17):2365-2370
- Gioacchini AM, Menotta M, Guescini M, Saltarelli R, Ceccaroli P, Amicucci A, Barbieri E, Giomaro G, Stocchi V (2008) Geographical traceability of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) by the analysis of volatile organic compounds. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22 (20):3147-3153
- Giraud T, Refregier G, LeGac M, deVienne DM, Hood ME (2008) Speciation in fungi. Fungal Genetics and Biology 45:791–802
- Goldstein D, Schlöterer C (1999) Microsatellite: evolution and applications. Oxford University Press Inc., Oxford,NY
- Green DJ, Clarke LJ, Mackay DA, Whalen MA (2011) Microsatellite markers for the freshwater shrimp *Paratya australiensis* (Atyidae). Conservation Genetics Resources 3 (2):295-297. doi:10.1007/s12686-010-9346-7
- Grismer LL (1999) An evolutionary classification of reptiles on islands in the Gulf of California, Mexico Herpetologica 55:446–469

- Grismer LL (2001) An evolutionary classification and checklist of amphibians and reptiles on the Pacific islands of Baja California, Mexico. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 100:12–23
- Guerin-Laguet A, Cummings N, Hesom-Williams N, Butler R, Wang Y (2013) Mycorrhiza analyses in New Zealand truffières reveal frequent but variable persistence of *Tuber melanosporum* in co-existence with other truffle species. *Mycorrhiza* 23 (2):87–98. doi:10.1007/s00572-012-0450-2
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Leger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11 (4):591–611. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59 (3):307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010
- Hacquard S, Tisserant E, Brun A, Legué V, Martin F, Kohler A (2013) Laser microdissection and microarray analysis of *Tuber melanosporum* ectomycorrhizas reveal functional heterogeneity between mantle and Hartig net compartments. *Environmental Microbiology*:n/a–n/a. doi:10.1111/1462-2920.12080
- Haeckel E (1866) *Generelle Morphologie der Organismen*. Reimer, Berlin
- Hale M, Alabergère G, Hale R (2010) Polymorphic microsatellite loci for the Banks Peninsula tree weta *Hemideina ricta*, and cross amplification in *H. femorata*. *Conservation Genetics Resources* 2 (0):329–331
- Hall IR, Yun W, Amicucci A (2003) Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21 (10):433–438. doi:10.1016/s0167-7799(03)00204-x
- Hansen K, LoBuglio KF, Pfister DH (2005) Evolutionary relationships of the cup-fungus genus *Peziza* and *Pezizaceae* inferred from multiple nuclear genes: RPB2, beta-tubulin, and LSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36 (1):1–23. doi:10.1016/j.ympev.2005.03.010
- Hartmann T (2007) From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68 (22–24):2831–2846. doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.017
- Hays JD, Imbrie J, Shackleton NJ (1976) Variations in the Earth's orbit : pacemaker of the Ice Ages. *Science* 194:1121–1132
- Hennig W (1966) *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana
- Henrion B, Chevalier G, Martin F (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 98:37–43
- Hewitt G (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359:183–195
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside

- JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111:509-547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hibbett DS, Matheny PB (2009) The relative ages of ectomycorrhizal mushrooms and their plant hosts estimated using Bayesian relaxed molecular clock analyses. *Bmc Biology* 7. doi:1310.1186/1741-7007-7-13
- Horn A, Roux-Morabito G, Lieutier F, Kerdelhue C (2006) Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomicus destruens* Woll. (Coleoptera: Scolytinae). *Molecular Ecology* 15:1603–1615
- Hurst GDD, Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272 (1572):1525-1534. doi:10.1098/rspb.2005.3056
- Hyman ED (1988) A new method of sequencing DNA. *Analytical Biochemistry* 174 (2):423-436. doi:10.1016/0003-2697(88)90041-3
- Iotti M, Amicucci A, Bonito G, Bonuso E, Stocchi V, Zambonelli A (2007) Selection of a set of specific primers for the identification of *Tuber rufum*: a truffle species with high genetic variability. *Fems Microbiology Letters* 277 (2):223-231. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00963.x
- Iotti M, Amicucci A, Stocchi V, Zambonelli A (2002) Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytologist* 155 (3):499-505. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00486.x
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443 (7113):818-822. doi:10.1038/nature05110
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11 (10):424-429. doi:10.1016/0169-5347(96)10049-5
- Jeandroz S, Murat C, Wang YJ, Bonfante P, Le Tacon F (2008) Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the 'true truffles'. *Journal of Biogeography* 35 (5):815-829. doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01851.x
- Johannesson K (2003) Evolution in *Littorina* : ecology matters. *Journal of Sea Research* 49:107-117

- Karagoyozov L, Kalcheva ID, Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research* 21 (16):3911-3912. doi:10.1093/nar/21.16.3911
- Karthick B, Williams DM (2012) The International Code for Nomenclature for algae, fungi and plants – a significant rewrite of the International Code of Botanical Nomenclature *Current Science* 102 (4):551-552
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from *Citrus* genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin magnetic particles. *BioTechniques* 16 (4):656-+
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford (UK): CAB International
- Kovalchuk O, Dubrova YE, Arkhipov A, Hohn B, Kovalchuk I (2000) Germline DNA - Wheat mutation rate after Chernobyl. *Nature* 407 (6804):583-584. doi:10.1038/35036692
- Lacourt I, Duplessis S, Abba S, Bonfante P, Martin F (2002) Isolation and characterization of differentially expressed genes in the mycelium and fruit body of *Tuber borchii*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9):4574-4582. doi:10.1128/aem.68.9.4574-4582.2002
- Laessle T, Hansen K (2007) Truffle trouble: what happened to the Tuberales? *Mycological Research* 111:1075-1099. doi:10.1016/j.mycres.2007.08.004
- Lambert DM, Spencer HG (1995) *Speciation and the recognition concept: Theory and application*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Lanfranco L, Wyss P, Marzachi C, Bonfante P (1993) DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. . *Fems Microbiology Letters* 114 (3):245-251. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06581.x
- Langae T, Ronaghi M (2005) Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 573 (1-2):96-102. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.07.023
- Larsson E, Jeppson M (2008) Phylogenetic relationships among species and genera of Lycoperdaceae based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycological Research* 112:4-22. doi:10.1016/i.mycres.2007.10.018
- Lathuilliere M, Menard N, Gautier-Hion A, Crouau-Roy B (2001) Testing the reliability of noninvasive genetic sampling by comparing analyses of blood and fecal samples in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *American Journal of Primatology* 55 (3):151-158. doi:10.1002/ajp.1048
- Lecointre G, Le Guyader H (2006) *The Tree of Life: A Phylogenetic Classification*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge MA. 560 pp.
- Lee RM, Thimmapuram J, Thinglum KA, Gong G, Hernandez AG, Wright CL, Kim RW, Mikel MA, Tranel PJ (2009) Sampling the Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) Genome Using Pyrosequencing Technology. *Weed Sci* 57 (5):463-469. doi:10.1614/ws-09-021.1

- Lefevre CK, Hall IR (2001) The status of truffle cultivation: A global perspective. In: Mehlenbacher SA (ed) Proceedings of the Fifth International Congress on Hazelnut. Acta Horticulturae, vol 556. pp 513-520
- LePage BA (2003) The evolution, biogeography and palaeoecology of the *Pinaceae* based on fossil and extant representatives. In: Mill RR (ed) Proceedings of the Fourth International Conifer Conference: Conifers for the Future? Acta Horticulturae, vol 615. pp 29-52
- LePage BA, Currah RS, Stockey RA, Rothwell GW (1997) Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. American Journal of Botany 84 (3):410-412. doi:10.2307/2446014
- Lepais O, Bacles CFE (2011) Comparison of random and SSR-enriched shotgun pyrosequencing for microsatellite discovery and single multiplex PCR optimization in *Acacia harpophylla* F. Muell. Ex Benth. Molecular Ecology Resources 11 (4):711-724. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03002.x
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing- a major mechanism for DNA-sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 4 (3):203-221
- Lewis PO (2001) Phylogenetic systematics turns over a new leaf. Trends in Ecology & Evolution 16 (1):30-37. doi:10.1016/s0169-5347(00)02025-5
- Li S (1996) Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte Carlo. Ph. D. Dissertation. Ohio State University.,
- Lim S, Notley-McRobb L, Lim M, Carter DA (2004) A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. Fungal Genetics and Biology 41 (11):1025-1036. doi:10.1016/j.fgb.2004.08.004
- Linnaeus C (1735) Systema naturae, sive regna tria naturae, systematice proposita per classes, ordines, genera & species.
- Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR (1999) An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). Molecular Ecology 8 (5):891-893
- Magain N, Forrest LL, Serusiaux E, Goffinet B (2010) Microsatellite primers in the *Peltigera dolichorhiza* complex (lichenized ascomycete, peltigerales). American Journal of Botany 97 (10):E102-E104. doi:10.3732/ajb.1000283
- Malausa T, Gilles A, Meglecz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Male PJG, Ferreira S, Martin JF (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Molecular Ecology Resources 11 (4):638-644. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x
- Mallet J (1995) A species definition for the modern synthesis. Trends in Ecology and Evolution 10:294-299
- Mannozi-Torini L (1970) Manuale di tartuficoltura. Bologna : Edagricole
- March RE, Richards DS, Ryan RW (2006) Volatile compounds from six species of truffle - head-space analysis and vapor analysis at high mass resolution. International Journal of Mass Spectrometry 249:60-67

- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen ZT, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu PG, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437 (7057):376-380. doi:10.1038/nature03959
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buee M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marcais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P (2010) Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464 (7291):1033-1038. doi:10.1038/nature08867
- Masters JC, Rayner RJ, McKay IJ, Potts AD, Nails D, Ferguson JW, Weissenbacher BK, Allsopp M, Anderson ML (1987) The concept of species: Recognition versus isolation. *South African Journal of Science* 83:534-537
- Masuda M, Washitani I (1992) Differentiation of spring emerging and autumn emerging ecotypes in *Galium spurium* L var *Echinosperrmon*. *Oecologia* 89 (1):42-46. doi:10.1007/bf00319013
- Matheny PB (2005) Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 (1):1-20. doi:10.1016/j.ympev.2004.11.014
- Mau B (1996) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. Ph.D. Dissertation. University of Wisconsin,
- Mauriello G, Marino R, D'Auria M, Cerone G, Rana GL (2004) Determination of volatile organic compounds from truffles via SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 42 (6):299-305
- Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. . In: *Species: The units of biodiversity*. Chapman and Hall, London, pp 381-424
- Mayr E (1942) *Systematics and the origin of species*. . Columbia University Press, New York.
- Meier R, Willmann R (2000) The Hennigian species concept. In: *Species concepts and phylogenetic theory* Columbia University Press, New York, pp 30-43
- Mello A, Cantisani A, Vizzini A, Bonfante P (2002) Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environmental Microbiology* 4 (10):584-594
- Metzger C, Ferchaud A-L, Geiser C, Ursenbacher S (2011) New polymorphic microsatellite markers of the endangered meadow viper (*Vipera ursinii*) identified by 454 high-throughput sequencing:

- when innovation meets conservation. *Conservation Genetics Resources* 3 (3):589-592. doi:10.1007/s12686-011-9411-x
- Micheneau C, Dauby G, Bourland N, Doucet JL, Hardy OJ (2011) Development and characterization of microsatellite loci in *Pericopsis elata* (*Fabaceae*) using a cost-efficient approach. *American Journal of Botany* 98 (10):E268-E270. doi:10.3732/ajb.1100070
- Michener CD (1970) Diverse approaches to systematics. *Evolutionary Biology* 4:1–38
- Mishler BD (1985) The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. *The Bryologist* 88:207–214.
- Molinier V, Murat C, Gollotte A, Martin F, Wipf D (in prep.) Ecotypes identification in *Tuber aestivum* Vittad. European populations by using specific SSR markers.
- Molinier V, Murat C, Morin E, Gollotte A, Wipf D, Martin F (2013) First Identification of Polymorphic Microsatellite Markers in the Burgundy Truffle, *Tuber aestivum* (*Tuberaceae*). *Applications in Plant Sciences* 1 (2):1200220. doi:10.3732/apps.1200220
- Molinier V, van Tuinen D, Chevalier G, Gollotte A, Wipf D, Redecker D (submitted) A multigene phylogeny demonstrates that *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum* are conspecific. *Organisms, Diversity and Evolution*
- Montecchi A, Lazzari G (1993) *Atlante fotografico di Funghi Ipogei*. Ed. Associazione Micologica Bresadola, Centro Studi Micologici, Trento, 490p
- Moore LR, Rocap G, Chisholm SW (1998) Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393 (6684):464-467
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *Plos Biology* 9 (8). doi:e100112710.1371/journal.pbio.1001127
- Morlon H, Parsons TL, Plotkin JB (2011) Reconciling molecular phylogenies with the fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (39):16327-16332. doi:10.1073/pnas.1102543108
- Mouches C, Duthil P, Bove J, Valjalo J, Delmas J (1978) Caractérisation des champignons supérieurs par électrophorèse de leurs protéines. *Mushroom Science* 10:491-503
- Mouches C, Duthil P, Poitou N, Delmas J, Bove J (1981) Caractérisation des espèces truffières par analyse de leurs protéines en gels de polyacrylamide et application de ces techniques à la taxonomie des champignons. *Mushroom Science* 11:819–831
- Murat C, Diez J, Luis P, Delaruelle C, Dupre C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 164 (2):401-411. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01189.x
- Murat C, Riccioni C, Belfiori B, Cichocki N, Labbe J, Morin E, Tisserant E, Paolocci F, Rubini A, Martin F (2011) Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* 48 (6):592-601. doi:10.1016/j.fgb.2010.10.007

- Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F, Robin C, Halkett F, Martin F, Paolocci F (2013) Fine scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytologist*:accepted
- Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Kuster H (2007) Sugar for my honey: Carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 68 (1):82-91. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.024
- Nelson G, Platnick NI (1981) Systematics and biogeography Columbia University Press, New York
- Nixon KC, Wheeler QD (1990) An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6:211-223.
- Olivier JM (2000) Progress in the cultivation of truffles. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vols 1 and 2.
- Olsen GJ, Matsuda H, Hagstrom R, Overbeek R (1994) fastDNAML - a tool for construction of phylogenetic trees of DNA-sequences using maximum-likelihood. *Computer Applications in the Biosciences* 10 (1):41-48
- Ostrander EA, Jong PM, Rine J, Duyk G (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8):3419-3423. doi:10.1073/pnas.89.8.3419
- Pacioni G, Frizzi G, Miranda M, Visca C (1993) Genetics of a *Tuber aestivum* population (Ascomycotina, Tubérales). *Mycotaxon* 47:93-100
- Pacioni G, Pomponi G (1989) Chemotaxonomy of some Italian species of *Tuber*. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* 4:63-72
- Pacioni G, Pomponi G (1991) Genotypic patterns of some italian populations of the *Tuber aestivum-Tuber mesentericum* complex. *Mycotaxon* 42:171-179
- Padovan ACB, Sanson GFO, Brunstein A, Briones MRS (2005) Fungi evolution revisited: Application of the penalized likelihood method to a bayesian fungal phylogeny provides a new perspective on phylogenetic relationships and divergence dates of ascomycota groups. *Journal of Molecular Evolution* 60 (6):726-735. doi:10.1007/s00239-004-0164-y
- Paetkau D (1999) Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *BioTechniques* 26 (4):690-+
- Palenzona M, Fontana A, Chevalier G (1972) Sintesi micorrizica tra *Tuber brumale* Vitt., *T. melanosporum* Vitt., *T. rufum* Pico in colture di micelio e semenzali di conifere e latifoglie. *Allionia* 18:41-52
- Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S (1999) Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28 (1):23-30. doi:10.1016/s0168-6496(98)00088-9
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Topini F, Arcioni S (2004) *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? *Fems Microbiology Letters* 235 (1):109-115

- Paterson HEH (1985) The recognition concept of species. In: Species and speciation. Transvaal Museum, Pretoria., pp 21–29
- Percudani R, Trevisi A, Zambonelli A, Ottonello S (1999) Molecular phylogeny of truffles (Pezizales : Terfeziaceae, Tuberaceae) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (1):169-180. doi:10.1006/mpev.1999.0638
- Perry JC, Rowe L (2011) Rapid Microsatellite Development for Water Striders by Next-Generation Sequencing. *Journal of Heredity* 102 (1):125-129. doi:10.1093/jhered/esq099
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors : causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847-859
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7):1253-1256. doi:10.1093/molbev/msn083
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818. doi:10.1093/bioinformatics/14.9.817
- Posada D, Crandall KA (2001) Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50 (4):580-601. doi:10.1080/106351501750435121
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16 (3):142-147. doi:10.1016/s0169-5347(00)02097-8
- Pruett GE, Bruhn JN, Mihail JD (2008) Colonization of Pedunculate oak by the Burgundy truffle fungus is greater with natural than with pelletized lime. *Agroforestry Systems* 72 (1):41-50. doi:10.1007/s10457-007-9069-2
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution* 8 (8):285-&. doi:10.1016/0169-5347(93)90256-o
- Quental TB, Marshall CR (2010) Diversity dynamics: molecular phylogenies need the fossil record. *Trends in Ecology & Evolution* 25 (8):434-441. doi:10.1016/j.tree.2010.05.002
- Rannala B, Yang ZH (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43 (3):304-311. doi:10.1007/bf02338839
- Rasmussen D, Noor M (2009) What can you do with 0.1x genome coverage? A case study based on a genome survey of the scuttle fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *BMC Genomics* 10 (1):382
- Rassmann K, Schlotterer C, Tautz D (1991) Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12 (2-3):113-118. doi:10.1002/elps.1150120205
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128 (1):9-17
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289 (5486):1920-1921. doi:10.1126/science.289.5486.1920

- Reid K, Hoareau TB, Bloomer P (2012) High-throughput microsatellite marker development in two sparid species and verification of their transferability in the family Sparidae. *Molecular Ecology Resources* 12 (4):740-752. doi:10.1111/j.1755-0998.2012.03138.x
- Ricard JM (2003) « La truffe, guide technique » Editions du Ctifl.
- Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolocci F (2008) *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist* 180 (2):466-478
- Richardson T, Cato S, Ramser J, Kahl G, Weising K (1995) Hybridization of microsatellites to RAPD - a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research* 23 (18):3798-3799. doi:10.1093/nar/23.18.3798
- Ridley M (1989) The cladistic solution to the species problem. *Biology and Philosophy* 4:1-16
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1-45
- Riousset L, Riousset G, Chevalier G, Bardet MC (2001) Truffes d'Europe et de Chine. INRA Editions, Paris, France
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 11 (1):3-11. doi:10.1101/gr.11.1.3
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* 242 (1):84-89. doi:10.1006/abio.1996.0432
- Ronaghi M, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1998a) PCR-Introduced loop structure as primer in DNA sequencing. *BioTechniques* 25 (5):876-+
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998b) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281 (5375):363-+. doi:10.1126/science.281.5375.363
- Rosen DE (1979) Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 162:267-376
- Rossiter S, Benda P, Dietz C, Zhang S, Jones G (2007) Rangewide phylogeography in the greater horseshoe bat inferred from microsatellites: implications for population history, taxonomy and conservation. *Molecular Ecology* 16:4699-4714
- Roux C, Sejalón-Delmas N, Martins M, Parguey-Leduc A, Dargent R, Becard G (1999) Phylogenetic relationships between European and Chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *Fems Microbiology Letters* 180 (2):147-155
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F (2011a) *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytologist* 189 (3):723-735. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03493.x
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F (2011b) Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 189 (3):710-722. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03492.x

- Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S (2005) Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11):6584-6589. doi:10.1128/aem.71.11.6584-6589.2005
- Rubini A, Topini F, Riccioni C, Paolocci F, Arcioni S (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Molecular Ecology Notes* 4 (1):116-118. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00587.x
- Saarenin EV, Austin JD (2010) When technology meets conservation: increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered Okaloosa darter (*Etheostoma okaloosae*). *Journal of Heredity*. doi:10.1093/jhered/esq080
- Saltarelli R, Ceccaroli P, Cesari P, Zeppa S, Potenza L, Stocchi V (1999) Strain differences in the mycelium of the ectomycorrhizal *Tuber borchii*. *Mycological Research* 103:1524-1528. doi:10.1017/s0953756299008898
- Schmitt T, Haubrich K (2008) The genetic structure of the mountain forest butterfly *Erebia euryale* unravels the late Pleistocene and postglacial history of the mountain coniferous forest biome in Europe. *Molecular Ecology* 17:2194-2207
- Schmitt T, Rakosy L, Abadjiev S, Müller P (2007) Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography* 34:939-950
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421. doi:10.1017/s0953756201005196
- Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota : a species list with new families and new genera. In. Gloucester,UK. 56 p,
- Selosse MA, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P (2004) Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47 (4):416-426. doi:10.1007/s00248-003-2034-3
- Sexton GJ, Frere CH, Dieters MJ, Godwin ID, Prentis PJ (2010) Development and characterization of microsatellite loci for *Khaya senegalensis* (Meliaceae). *American Journal of Botany* 97 (11):E111-E113. doi:10.3732/ajb.1000300
- Shaw KL (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25):16122-16127. doi:10.1073/pnas.242585899
- Simpson GG (1951) The species concept. *Evolution* 5:285-298
- Singer S (1947) Sprichwörter des Mittelalters: Das 13. und 14. Jahrhundert. H. Lang,
- Sisti D, Giomaro G, Cecchini M, Faccio A, Novero M, Bonfante P (2003) Two genetically related strains of *Tuber borchii* produce *Tilia* mycorrhizas with different morphological traits. *Mycorrhiza* 13 (2):107-115. doi:10.1007/s00572-002-0220-7
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* Academic Press, London

- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
- Sokal RR, Crovello TJ (1970) The biological species concept: A critical evaluation. . The American Naturalist 104:127–153.
- Soltis ED, Soltis PS (2000) Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. Plant Molecular Biology 42 (1):45-75. doi:10.1023/a:1006371803911
- Somme L, Raabova J, Jacquemart AL, Raspe O (2012) Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae). Molecular Ecology Resources 12 (1):91-97. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03072.x
- Song MS, Cao JZ, Yao YJ (2005) Occurrence of *Tuber aestivum* in China. Mycotaxon 91:75-80
- Spatafora JW, Sung GH, Johnson D, Hesse C, O'Rourke B, Serdani M, Spotts R, Lutzoni F, Hofstetter V, Miadlikowska J, Reeb V, Gueidan C, Fraker E, Lumbsch T, Lucking R, Schmitt I, Hosaka K, Aptroot A, Roux C, Miller AN, Geiser DM, Hafellner J, Hestmark G, Arnold AE, Budel B, Rauhut A, Hewitt D, Untereiner WA, Cole MS, Scheidegger C, Schultz M, Sipman H, Schoch CL (2006) A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. Mycologia 98 (6):1018-1028
- Splivallo R, Bossi S, Maffei M, Bonfante P (2007) Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. Phytochemistry 68 (20):2584-2598
- Splivallo R, Fischer U, Gobel C, Feussner I, Karlovsky P (2009) Truffles Regulate Plant Root Morphogenesis via the Production of Auxin and Ethylene. Plant Physiology 150 (4):2018-2029. doi:10.1104/pp.109.141325
- Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P (2011) Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. New Phytologist 189 (3):688-699. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03523.x
- Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt JP, Feussner I, Karlovsky P (2012) Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. New Phytologist 194 (3):823-835. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04077.x
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22 (21):2688-2690. doi:10.1093/bioinformatics/btl446
- Stockinger H, Walker C, Schussler A (2009) '*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. New Phytologist 183 (4):1176-1187. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x
- Talou T, Delmas M, Gaset A (1987) Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. Journal of Agricultural and Food Chemistry 35 (5):774-777. doi:10.1021/jf00077a031
- Talou T, Delmas M, Gaset A (1989a) Analysis of headspace volatiles from entire black truffle (*Tuber melanosporum*). Journal of the Science of Food and Agriculture 48 (1):57-62. doi:10.1002/jsfa.2740480108
- Talou T, Delmas M, Gaset A (1989b) New trends in black truffle aroma analysis. Acs Symposium Series 388:202-212

- Talou T, Gaset A, Delmas M, Kulifaj M, Montant C (1990) Dimethyl sulfide : the secret for black truffle hunting by animals. *Mycological Research* 94:277-278
- Tangphatsornruang S, Somta P, Uthapaisanwong P, Chanprasert J, Sangsrakru D, Seehalak W, Sommanas W, Tragoonrung S, Srinives P (2009) Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Bmc Plant Biology* 9. doi:13710.1186/1471-2229-9-137
- Taylor J, Turner E, Townsend JP, Dettman JR, Jacobson D (2006) Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 361:1947-1963
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31 (1):21-32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjöller R (2006) Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170 (3):581-596. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01687.x
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20 (4):217-263. doi:10.1007/s00572-009-0274-x
- Templeton AR (1989) The meaning of species and speciation: A genetic perspective. . In: *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts., pp 3-27
- Templeton AR (1998) Species and speciation: Geography, population structure, ecology, and gene trees. In: *Species and speciation*. Oxford University Press, New York., pp 32-43
- Todd E, Blair D, Hamann M, Jerry D (2011) Twenty-nine microsatellite markers for two Australian freshwater turtles, *Elseya albagula* and *Emydura macquarii krefftii*: development from 454-sequence data and utility in related taxa. *Conservation Genetics Resources* 3 (3):449-456. doi:10.1007/s12686-010-9377-0
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10 (7):967-981. doi:10.1101/gr.10.7.967
- Trail F (2007) Fungal cannons: explosive spore discharge in the Ascomycota. *Fems Microbiology Letters* 276 (1):12-18. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00900.x
- Trappe J (2005) On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15 (4):267-275. doi:10.1007/s00572-004-0329-y
- Turesson G (1922) The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas* 3:211-350
- Turgeman T, Sitrit Y, Danai O, Luzzati Y, Bustan A, Roth-Bejerano N, Kagan-Zur V, Masaphy S (2012) Introduced *Tuber aestivum* replacing introduced *Tuber melanosporum*: a case study. *Agroforestry Systems* 84 (3):337-343. doi:10.1007/s10457-011-9478-0
- Udupa SM, Baum M (2001) High mutation rate and mutational bias at (TAA)(n) microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 265 (6):1097-1103. doi:10.1007/s004380100508

- Urbanelli S, Sallicandro P, De Vito E, Bullini L, Biocca E (1998) Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. *Mycologia* 90 (3):537-546
- Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P (1994) Variation in short tandem repeat sequences - a survey of 12 microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine* 107 (1):13-20. doi:10.1007/bf01247268
- Van Valen L (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25:233-239
- Vanpe C, Buschiazzi E, Abdelkrim J, Morrow G, Nicol SC, Gemmell NJ (2009) Development of microsatellite markers for the short-beaked echidna using three different approaches. *Australian Journal of Zoology* 57 (3-4):219-224. doi:10.1071/zo09033
- Vargas A, Elzinga DB, Rojas-Beltran JA, Bonifacio A, Geary B, Stevens MR, Jellen EN, Maughan PJ (2011) Development and use of microsatellite markers for genetic diversity analysis of canahua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Genetic Resources and Crop Evolution* 58 (5):727-739. doi:10.1007/s10722-010-9615-z
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23 (1):48-55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005
- Vellinga E, Wolfe B, Pringle A (2009) Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist* 181:960-971.
- Vincenot L, Nara K, Sthultz C, Labbe J, Dubois MP, Tedersoo L, Martin F, Selosse MA (2012) Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* complex. *Molecular Ecology* 21 (2):281-299. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05392.x
- Vittadini C (1831) *Monographia tuberacearum*. Rusconi, Milan
- Von der Schulenburg JH, Hancock J, Pagnamenta A, Sloggett J, Majerus M, Hurst G (2001) Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology and Evolution* 18:648-660
- Wang YJ, Tan ZM, Zhang DC, Murat C, Jeandroz S, Le Tacon F (2006) Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle, and other *Tuber* species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. *Fems Microbiology Letters* 259 (2):269-281. doi:10.1111/j.1574-6868.2006.00283.x
- Weden C (2004) Black truffles of Sweden : Systematics, Population studies, Ecology and Cultivation of *Tuber aestivum* syn *T.uncinatum*. Uppsala
- Weden C, Danell E, Tibell L (2005) Species recognition in the truffle genus *Tuber* - the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environmental Microbiology* 7 (10):1535-1546. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00837.x
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* Academic Press, San Diego, CA
- Whittaker RH (1959) On the broad classification of organisms. *Quarterly Review of Biology* 34 (3):210-226. doi:10.1086/402733

Références bibliographiques

- Whittaker RH (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163 (3863):150-&. doi:10.1126/science.163.3863.150
- Wiley EO (1978) The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic zoology* 27:17–26
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms - proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12):4576-4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Wright S (1940) The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. In: *The new systematics* Oxford University Press, London, pp 161–183
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Wu KS, Jones R, Danneberger L, Scolnik PA (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* 22 (15):3257-3258. doi:10.1093/nar/22.15.3257
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11 (1):1-16. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x
- Zeppa S, Gioacchini AM, Guidi C, Guescini M, Pierleoni R, Zambonelli A, Stocchi V (2004) Determination of specific volatile organic compounds synthesised during *Tuber borchii* fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18 (2):199-205. doi:10.1002/rcm.1313